

ELEKTROPHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN
DES ELEKTROGENEN NA-TRANSPORTES
AN ISOLIERTEN UND KULTIVIERTEN
PURKINJEZELLEN

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie an
der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

Thomas Krahn

Bochum 1989

Tag der mündlichen Prüfung: 04. Oktober 1989

Referent: Prof. Dr. H. G. Glitsch

Korreferent : Prof. Dr. H. Machemer

Herrn Prof. Dr. H. G. Glitsch gilt mein besonderer Dank für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die zahlreichen, anregenden Diskussionen bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Dr. H. Pusch danke ich für die Unterstützung bei mathematischen Fragestellungen und die ständige Bereitschaft zur Diskussion.

Herrn Prof. Dr. F. Verdonck gilt mein Dank für die erfolgreiche Zusammenarbeit und anregende Diskussion zu Abschnitt 3.4.3 der vorliegenden Arbeit.

Herrn Prof. Dr. M. Hauser danke ich für die Unterstützung bei der morphologischen Charakterisierung der isolierten und kultivierten Einzelzellen und die Überlassung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Mein Dank gilt außerdem Herrn P. Greger für die Anfertigung zahlreicher Bauteile und Herrn W. Grabowski für die Hilfe bei der Verschaltung des Versuchsstandes.

Die Unterstützung durch Frau A. Balzer-Ferrai bei der Erstellung der Abbildungen möchte ich dankbar würdigen.

Die Untersuchungen zu dieser Arbeit entstanden zum Teil mit finanzieller Unterstützung durch die Forschergruppe der DFG: Membrankontrolle der Zellaktivität "Konzell".

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	
1.1 Aktive Transportprozesse	1
1.2 Die physiologische Bedeutung der Na/K-Pumpe	2
1.3 Methoden zur Erforschung der Na/K-ATPase	3
1.4 Die Wirkungsweise der Na/K-Pumpe	4
1.5 Hemmstoffe des aktiven Na-Transportes	8
1.6 Die Na/K-Pumpe in Herzzellen	9
1.7 Die Spannungsabhängigkeit des aktiven Na-Transportes am Herzen	12
1.8 Untersuchung des aktiven Na-Transportes an isolierten Herzzellen	13
1.9 Aufgabenstellung	15
II. Material und Methoden	
2.1 Isolierung und Kultivierung von Purkinjezellen aus dem Schafherzen	16
2.2 Lösungen für Patch-clamp-Experimente	
2.2.1 Lösungen für die Bestimmung der Abhängigkeit der Na/K-Pumpe von der intrazellulären Na-Konzentration	19
2.2.2 Lösungen für die Bestimmung der Abhängigkeit der Na/K-Pumpe von der intra- bzw. extrazellulären Mg-Konzentration	20
2.2.3 Lösungen für die Bestimmung der Abhängigkeit der Na/K-Pumpe von der extrazellulären K- bzw. Cs-Konzentration	20
2.2.4 Lösungen für die Bestimmung der Spannungsabhängigkeit der Na/K-Pumpe	21
2.3 Versuchsaufbau	21
2.4 Versuchsdurchführung	28
2.5 Auswertung	32
2.6 Statistik	34
III. Ergebnisse	
3.1 Isolierung und Kultivierung von Purkinjezellen aus dem Warmblüterherzen	35

3.2	Elektrophysiologische Eigenschaften der kultivierten Purkinjezellen	42
3.3	Nachweis des elektrogenen Na-Transportes	45
3.4	Abhängigkeit des Na/K-Pumpenstromes	
3.4.1	- von der intrazellulären Na-Konzentration	47
3.4.2	- von der intra- und extrazellulären Mg-Konzentration	51
3.4.3	- von der extrazellulären K ⁺ - und Cs-Konzentration	61
3.5	Die Pumpenstrom-Spannungs-Beziehung und ihre Beeinflussung durch die Na ⁺ - und Cs ⁺ -Konzentration	69
IV.	Diskussion	
4.1	Isolierung und Kultivierung von Purkinjezellen aus dem Schafherzen	81
4.2	Patch-clamp-Messungen an Purkinjezellen	83
4.3	Abhängigkeit des aktiven Na-Transportes	
4.3.1	- von der intrazellulären Na-Konzentration	85
4.3.2	- von der intrazellulären Mg-Konzentration	88
4.3.3	- von der extrazellulären K ⁺ - und Cs-Konzentration	91
4.4	Die Spannungsabhängigkeit des aktiven Na-Transportes	93
4.5	Die Abnahme der Pumpenstromamplitude in Abhängigkeit von der Versuchsdauer	97
4.6	Ist I _p ein zuverlässiges Maß für die Na/K-Pumpenaktivität?	98
V.	Zusammenfassung	101
Va.	Summary	103
VI.	Liste der Abkürzungen	105
VII.	Literaturverzeichnis	107
VIIa.	Anhang zum Literaturverzeichnis	126

I. Einleitung

1.1 Aktive Transportprozesse

Alle Lebewesen, Pflanzen wie Tiere, vom Einzeller bis zum vielzelligen Organismus, sind in der Lage, Stoffe in sich aufzunehmen und zu konzentrieren. Sofern die Stoffe gegen einen Konzentrationsgradienten transportiert werden, muß die Zelle für diesen aktiven Transport Energie bereitstellen. Membranbausteine, welche für den aktiven Transport verantwortlich sind, werden als zelluläre "Pumpen" (vergl. Dean 1941) bezeichnet.

Eine Form des aktiven Transportes wird durch Adenosintriphosphat-spaltende, membrangebundene Enzyme (ATPasen) bewerkstelligt. Bei Bakterien (Prokaryoten) werden ein Teil der Protonen und K-Ionen unter Verbrauch von ATP aus der Zelle herausgepumpt. Auch bei den eukaryotischen Pflanzen (Pilze, niedere und höhere Pflanzen) sind protonentransportierende Enzyme (H^+ -ATPasen) für die Erzeugung eines Ionengradienten ($c^0_H > c^1_H$ d.h. $pH_0 < pH_1$) verantwortlich (vergl. Mitchell 1963). In tierischen Organismen wird hauptsächlich Natrium unter ATP-Verbrauch aus der Zelle heraustransportiert ($c^0_{Na} > c^1_{Na}$). Das ATP liefern die Mitochondrien und in pflanzlichen Zellen auch die Chloroplasten (vergl. Tanner 1985, Pedersen & Carafoli 1987). Sequenzanalysen lassen vermuten, daß alle membranständigen Transport-ATPasen auf eine gemeinsame Urform zurückzuführen sind (Shull et al. 1985, Jørgensen & Andersen 1988). Das bedeutet, daß eine derart wichtige Entwicklung für das Leben auf der Erde sich nur einmal vollzogen hat.

Nahezu alle tierischen Zellen besitzen eine Na/K-Pumpe (vergl. Skou 1965). Ausnahmen sind die Erythrozyten einiger Katzen- und Hundarten (siehe Parker 1977). Das biochemische Äquivalent der Na/K-Pumpe ist eine membrangebundene ATPase (E.C.3.6.1.3), welche in der Gegenwart von Na^+ , K^+ und Mg^{++} die energiereiche Verbindung ATP hydrolysiert (Skou 1957, Übersichten: Schwartz et al.

1975, Robinson & Flashner 1979, Jørgensen 1980, Schuurmans Stekhoven & Bonting 1981). Die Begriffe Na/K-Pumpe und Na/K-ATPase werden daher gleichbedeutend benutzt. Ionenpumpen, welche einen Ionengradienten unter Einsatz von Stoffwechselenergie aufbauen oder aufrecht erhalten, leisten einen primär aktiven Transport (vergl. Ussing 1954, Keynes 1961, Läuger 1969). Ein Substratfluß, welcher einen aufgebauten Ionengradienten benötigt, wird als sekundär aktiver Transport bezeichnet.

1.2 Die physiologische Bedeutung der Na/K-Pumpe

Die Wichtigkeit des primär aktiven Na-Transportes für die Zelle läßt sich an der folgenden Tabelle abschätzen, welche die Zellfunktionen nennt, die direkt oder indirekt von der Na/K-Pumpe abhängig sind (Schwartz et al. 1972, De Weer 1985).

Tabelle 1: Funktionen der Na/K-Pumpe

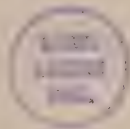
- Aufrechterhaltung der Na- und K-Ionengradienten über der Zellmembran
- Regulation des Zellvolumens
- Beitrag zur Wärmeproduktion der Zelle
- Aufrechterhaltung des Membranpotentials
- Aufrechterhaltung der Ionengradienten, die für die elektrische Erregbarkeit notwendig sind
- Beeinflussung des Ruhe- und Aktionspotentials durch den Pumpenstrom
- Regulation der intrazellulären Ca^{++} , Mg^{++} und H^{+} -Konzentration
- gekoppelte Chloridbewegungen über den Na/K/2Cl-Cotransport
- Cotransport von Zuckern, Aminosäuren, Oligopeptiden und Vitaminen
- Reabsorption von Neurotransmittern (z.B. Gammaaminobuttersäure) und anderen organischen Säuren (z.B. Paraaminohippursäure)
- Transport von Salz und Wasser durch Epithelien

Klinisch ist von besonderer Bedeutung, daß durch Medikamente, die die Na/K-Pumpe hemmen, die Herzmuskelkontraktion beeinflußt werden kann.

1.3 Methoden zur Erforschung der Na/K-ATPase

Die Eigenschaften der Na/K-ATPase sind an einer Vielzahl von Zellen unter biochemischen, pharmakologischen und physiologischen Gesichtspunkten untersucht worden (Übersichtsartikel: Skou 1965, Bonting 1970, Schwartz et al. 1972, Dahl & Hokin 1974, Glynn & Karlish 1975, Robinson & Flashner 1979, Schuurmans Stekhoven & Bonting 1981).

Die Erforschung der Na/K-Pumpe bzw. der Na/K-ATPase erfolgt mit verschiedenen Methoden. In biochemischen Untersuchungen wird das Enzym aus einem Gewebe isoliert und aufgereinigt (vergl. Cantley 1981). Die Schwierigkeit dieses Vorgehens besteht darin, die Orientierung des Enzyms zu berücksichtigen, z.B. die Unterscheidung zwischen einer extra- oder intrazellulären Bindungsstelle. In physiologischen Experimenten wird die Na/K-Pumpe mit Hilfe radioaktiver Substanzen oder elektrophysiologischer Methoden an isolierten Zellen oder Geweben untersucht. Einen Austausch des intrazellulären Milieus und eine Untersuchung der Abhängigkeit der Na/K-Pumpe von intrazellulären Parametern ermöglicht die Verwendung von Tintenfischriesenaxonen. Als Einzelzellen werden neben den roten Blutkörperchen auch große Neurone verschiedener Weichtiere verwendet. Eine Brücke zwischen den genannten experimentellen Ansätzen stellen die Untersuchungen von Na/K-Pumpen in Zellmembranvesikeln und rekonstituierten Erythrozyten dar (z.B. Gardos 1954, Whittam 1962, Philipson & Nishimoto 1982, 1983, Karlish & Stein 1985, Goldshlegger et al. 1987, Sachs 1988a, b).



1.4 Die Wirkungsweise der Na/K-Pumpe

Die Na/K-Pumpe transportiert Natrium aus der Zelle gegen einen Konzentrations- und Potentialgradienten. Im Gegenzug erfolgt der Transport von Kalium in die Zelle gegen einen Konzentrationsgradienten. Die Energie für den Transport liefert die Hydrolyse von intrazellulärem ATP zu Adenosindiphosphat (ADP) und Orthophosphat (P_i). Da die meisten Zellmembranen für ATP undurchlässig sind (Pedersen & Carafoli 1987), muß es in der Zelle nachgebildet werden. Das Zusammenspiel von ATP-Synthese und ATP-Hydrolyse ist von übergeordneter Bedeutung für die Lebensfähigkeit aller Zellen. Der Mensch setzt in Ruhe ca. 50 Prozent seines Körpergewichtes an ATP pro Tag um. Bei körperlicher Anstrengung kann dieser Wert auf mehr als das 10fache seines Körpergewichtes gesteigert werden (vergl. Ericinska & Wilsen 1978). Dieser hohe Umsatz wird durch verschiedene ATPasen getragen. Zu den wichtigsten ATPasen im Tierreich gehört die Na/K-ATPase.

Die Hydrolyse von ATP liefert eine bestimmte Menge freier Energie, die für den Transport von Na- und K-Ionen zur Verfügung steht. Aufgrund thermodynamischer Betrachtungsweisen kann das Umkehrpotential V_0 der Na/K-Pumpe definiert werden (vergl. Gleichung 1) als das Membranpotential, an dem die benötigte Energie für den Transport von 3 Na⁺ und 2 K⁺ gegen die Konzentrations- und den Potentialgradienten genau der freien Energie (ΔG_{ATP}) aus der Hydrolyse von ATP zu ADP und P_i entspricht. Auf diesem Membranpotential erfolgt keine chemische Reaktion und es kann kein Pumpenstrom gemessen werden (vergl. Chapman & Johnson 1978, Tanford 1981, De Weer et al. 1988).

Physikochemisch läßt sich der Sachverhalt mit folgender Gleichung ausdrücken (vergl. Läger & Apell 1986):

$$V_0 = \frac{\Delta G_{ATP}}{z \cdot F} + \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \left(3 \ln \frac{c^o_{Na}}{c^i_{Na}} - 2 \ln \frac{c^o_K}{c^i_K} \right) \quad (1)$$

oder:

$$V_0 = \frac{\Delta G_{ATP}}{z \cdot F} + 3 E_{Na} - 2 E_K \quad (2)$$

ΔG_{ATP} : freie Energie aus der ATP-Hydrolyse in $J \cdot mol^{-1}$
($A \cdot V \cdot s \cdot mol^{-1}$)

z : Wertigkeit

F : Faradaykonstante in $A \cdot s \cdot mol^{-1}$

R : allgemeine Gaskonstante in $J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$

T : Temperatur in K (Kelvin)

E_K : elektrochemisches K-Gleichgewichtspotential in mV

E_{Na} : elektrochemisches Na-Gleichgewichtspotential in mV

Bei einem Potential positiv von V_0 läuft die Na/K-Pumpe "vorwärts" und generiert einen Auswärtsstrom. Potentiale negativ von V_0 lassen den aktiven Na-Transport "rückwärts" laufen und führen zu einem Einwärtsstrom durch die Na/K-Pumpe (Glynn & Lew 1970, De Weer & Rakowski 1984, Bahinski et al. 1988).

In den Abbildungen 1 und 2 sind Modelle der Na/K-Pumpe dargestellt. Das einfache Schema der Abb. 1A zeigt den Transport von 3 Na^+ aus der Zelle und von 2 K^+ ins Zellinnere, verbunden mit der Spaltung von einem ATP-Molekül in ADP und P_i . Post und Jolly (1957) fanden an menschlichen Erythrozyten eine Stimulierung der Na/K-ATPase durch extrazelluläre K-Ionen und intrazelluläre Na-Ionen. Die festgestellte Stöchiometrie von 3 Na^+ : 2 K^+ (Post & Jolly 1957, Garrahan & Glynn 1967b) läßt vermuten, daß die Na/K-Pumpe einen elektrischen Strom generiert. Die Elektrogenität der Na/K-Pumpe am Herzen wird seit den Untersuchungen von Délèze (1960) sowie Page und Storm (1965) diskutiert. Der durch die Na/K-Pumpe erzeugte Auswärtsstrom I_p beruht auf dem Auswärtstransport einer positiven Ladung pro Pumpenzyklus. Das Fließen eines Auswärtsstromes verursacht eine Hyperpolarisation der Zellmembran. Eine Änderung der Pumpenaktivität führt also direkt zu einer Änderung des Membranpotentials. Andererseits sollte auch eine Potentialänderung einen Einfluß auf die Pumpenstromamplitude haben. Aus thermodynamischen Gründen wird eine Spannungsabhängigkeit von I_p erwartet. Versuche

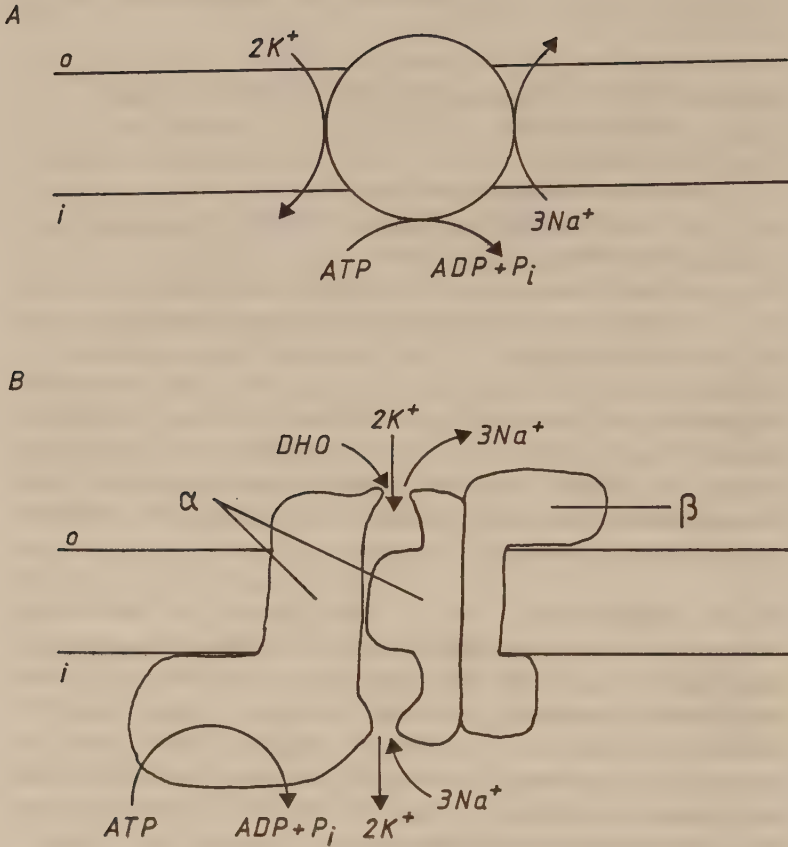


Abb.1 Verschiedene Modelle für den aktiven Na-Transport.

A. Einfaches Schema des elektrogenen Na/K-Transportes (o: außen; i: innen).

B. Na/K-Pumpe (molekularbiologisches Modell) aus einer α - und einer β -Untereinheit, modifiziert nach Rossier et al. (1987). Die α -Untereinheit mit der Durchtrittsstelle für Natrium und Kalium besitzt eine intrazelluläre Ausstülpung, an der ATP hydrolysiert wird. Die β -Untereinheit hat einen extrazellulären Fortsatz.

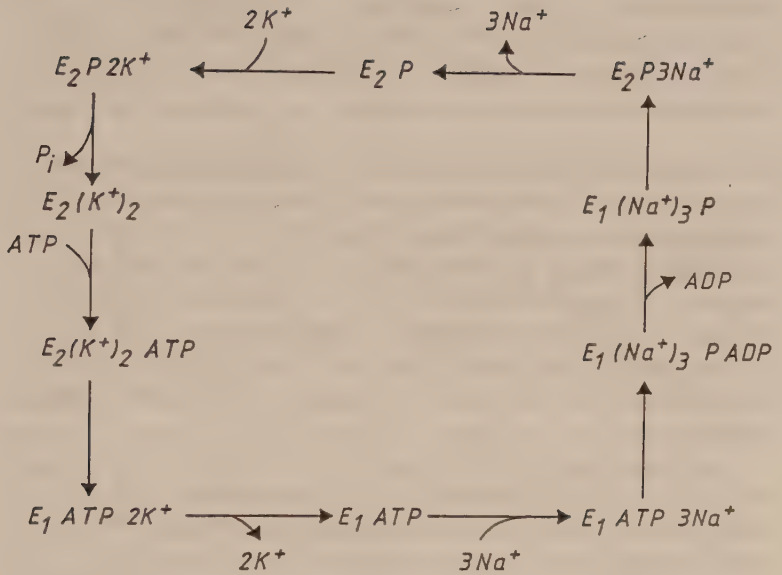


Abb.2 Modifiziertes Albers-Post Schema.

In dem biochemischen Modell wird eine Konformationsänderung des Transportenzyms (E₁ - E₂) berücksichtigt. Die runden Klammern verdeutlichen eine spezielle Bindung von Na⁺ und K⁺ an die Transport-ATPase (Okklusion).

an Tintenfischriesenaxonen deuteten jedoch auf eine Unabhängigkeit des aktiven Na-Transportes vom Membranpotential (Hodgkin & Keynes 1955, Brinley & Mullins 1970) ebenso wie die Untersuchungen von Marmor (1971) an Schneckenneuronen.

Das molekularbiologische Modell Abb. 1B zeigt die Na/K-Pumpe als ein Heterodimer aus einer α - und einer β -Untereinheit. Die $\alpha\beta$ -Einheit besitzt eine intrazelluläre Ausstülpung der α -Untereinheit und einen extrazellulären Fortsatz der β -Untereinheit mit 3 Zuckerbindungsstellen. Die einzige bekannte Aufgabe der β -Untereinheit (40-60 kDa) ist es, die α -Untereinheit (ca. 112 kDa) in der Zellmembran zu verankern (vergl. Rossier et al. 1987, Jørgensen & Andersen 1988).

Eine detailliertere Vorstellung des Pumpenzyklus gibt Abb. 2 wieder (vergl. Eisner 1986, Jørgensen & Andersen 1988). Die phosphorylierten und dephosphorylierten Formen der Transport-ATPase kommen in zwei verschiedenen Konformationen vor (E_1 und E_2). Die beiden Formen unterscheiden sich in der Affinität und Orientierung der Kationenbindungsstellen.

1.5 Hemmstoffe des aktiven Na-Transportes

Für die Untersuchung des aktiven Na-Transportes sind spezifische Hemmstoffe, die Herzglykoside, besonders wichtig. Seit der Beschreibung der Digitalis-Wirkung durch William Withering im Jahre 1785 (siehe Lee 1985) werden Herzglykoside in der Therapie der Herzinsuffizienz eingesetzt. Sie bewirken in der klinischen Anwendung eine Erhöhung der Kontraktionskraft des Herzens und eine Senkung der Herzschlagfrequenz. Eine Hemmung der Na/K-Pumpe durch Herzglykoside (Schatzmann 1953, Kahn 1957) ist die Ursache für beide Effekte. Die herzwirksamen Steroide führen in Abhängigkeit von ihrer Konzentration zunächst zu einer Zunahme der Kontraktionskraft (therapeutische Wirkung) und bei höheren Konzentrationen zu einer Abnahme (mechanische Toxizität).

Die verschiedenen Herzglykoside unterscheiden sich hinsichtlich ihrer therapeutischen Wirksamkeit unter anderem durch unterschiedliche Resorbierbarkeit und unterschiedliche Wirkungsdauer aufgrund unterschiedlicher Plasma-Eiweißbindung. Für elektrophysiologische Experimente sind die unterschiedlichen Bindungs- und Dissoziationskonstanten interessant. Herzglykoside mit niedrigen Bindungskonstanten sind für in vitro-Versuche geeignet, da sie infolge des besseren Auswaschverhaltens in ihrer Wirkung schneller reversibel sind (Deitmer & Ellis 1978, Daut & Rüdel 1982). Strophanthidin, Acetyl-strophanthidin und Dihydro-g-strophanthin (Dihydroouabain, DHO) lassen sich besser auswaschen als z.B. g-Strophanthin (Ouabain). DHO hat gegenüber anderen Herzglykosiden den weiteren Vorteil, daß niedrige Konzentrationen nicht zu einer Aktivierung der Na/K-Pumpe führen (vergl. Godfraind & Ghysel-Burton 1977, Deitmer & Ellis 1978). DHO wirkt entweder hemmend oder gar nicht auf die Na/K-ATPase. Die gute Wasserlöslichkeit von DHO ermöglicht zudem eine einfache Handhabung des Herzglykosides.

1.6 Die Na/K-Pumpe in Herzzellen

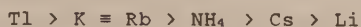
Wie andere tierische Zellen haben auch Herzzellen eine intrazelluläre Natriumkonzentration (c^i_{Na}), welche wesentlich niedriger ist als die extrazelluläre Natriumkonzentration (c^e_{Na}). Die intrazelluläre Kaliumkonzentration (c^i_K) dagegen ist deutlich höher als die extrazelluläre Kaliumkonzentration (c^e_K). In einem schlagenden Herzen führt jedes Aktionspotential zu einem Na-Einstrom und zu einem K-Ausstrom. Die Bildung eines normalen Aktionspotentials beruht aber auf der Aufrechterhaltung eines steilen Konzentrationsgradienten für Na^+ und K^+ . Die "Abwärts"-Bewegung der Ionen entlang ihrer elektrochemischen Gradienten wird durch den aktiven "Aufwärts"-Transport der Na/K-Pumpe kompensiert. Der aktive Na- und K-Transport ist auch für viele regulative Vorgänge in der Herzzelle wichtig. Eine Übersicht geben die Arbeiten

von Glitsch (1970, 1982), Gadsby (1984) sowie Glitsch und Krahn (1986).

Eine halbmaximale Aktivierung der Na/K-Pumpe durch intrazelluläres ATP fanden Philipson und Nishimoto (1983) in Sarkolemmvesikeln aus Hundeherzen bei 0,21 mM ATP. Vergleichbare Werte berechneten auch Matsui und Schwartz (1966) sowie Sperelakis und Lee (1971) aus Versuchen mit aufgereinigter Na/K-ATPase aus Herzzellmembranen.

Die Aktivität der Na/K-Pumpe kann auch an Herzzellen durch die extrazelluläre K-Konzentration verändert werden (Bosteels & Carmeliet 1972, Deitmer & Ellis 1978, Eisner & Lederer 1979, Gadsby 1980, Glitsch & Pusch 1980, Eisner 1986, Glitsch & Krahn 1986). Die K-Außenkonzentrationen, bei denen die Na/K-Pumpe halbmaximal aktiviert ist ($K_{0,5}$), unterscheiden sich bei den untersuchten Arten und Herzgeweben. Aber auch bei gleichen Versuchspräparaten führen verschiedene Meßmethoden zu unterschiedlichen Ergebnissen. Die Abhängigkeit der Na/K-Pumpenaktivität von der extrazellulären Aktivatorkationen-Konzentration wird meist mit einer der beiden folgenden Methoden untersucht. Entweder erfolgt eine kinetische Messung des aktiven Na-Transportes während einer erhöhten Pumpenrate oder eine Messung von I_p im stationären Zustand (steady-state) mit verschiedenen extrazellulären Konzentrationen des Aktivatorkations (*vergl.* Eisner et al. 1981b, Glitsch et al. 1981). In Purkinjefäden aus Schafherzen wurden bei kinetischen Messungen höhere $K_{0,5}$ -Werte gefunden als in steady-state-Messungen (Eisner et al. 1981b). Dieser Unterschied ist möglicherweise auf die besondere morphologische Struktur des Purkinjefadens (Mobley & Page 1972) zurückzuführen. In den engen extrazellulären Spalträumen kommt es durch eine starke Aktivierung des aktiven Na-Transportes zu einer Abnahme der Konzentration an extrazellulären Aktivatorkationen und damit zu einer falsch zu hohen Schätzung für den $K_{0,5}$ -Wert. Eine Reihe von Untersuchungen haben jedoch ergeben, daß die K-Bindungsstellen der Na/K-Pumpe im Bereich physiologischer c_K nahezu vollständig besetzt sind (*vergl.* Glitsch et al.

1978, Gadsby 1980, Daut 1983, Krahn 1986). Die Na/K-ATPase kann außer durch extrazelluläres Kalium auch durch eine Reihe anderer Kationen aktiviert werden. Die verschiedenen Ionen haben folgende relative Wirkungsstärke im Vergleich zum Kalium:



(vergl. Portius & Repke 1967, Eisner & Lederer 1979, 1980a, b)

Das intrazellulär aktivierende Natrium kann nicht durch andere einwertige Kationen ersetzt werden. Über eine Variation von c'_{Na} bzw. der intrazellulären Na-Aktivität (a'_{Na}) ist eine Änderung des aktiven Na-Ausstromes möglich (Page & Storm 1965, Glitsch 1969, 1972, 1979, Vassalle 1970, Hiraoka & Hecht 1973, Deitmer & Ellis 1978, Eisner et al. 1981a, Gadsby 1984). Eine Erhöhung von c'_{Na} kann durch eine hochfrequente Reizung (Vassalle 1970) oder aufgrund einer Hemmung der Na/K-Pumpen durch Hypothermie erfolgen (Délèze 1960, Page & Storm 1965, Glitsch 1969, Hiraoka & Hecht 1973). Entzug der extrazellulären Aktivator-kationen erhöht ebenfalls die intrazelluläre Na-Konzentration (Deitmer & Ellis 1978, Eisner et al. 1981a, b, Glitsch et al. 1982).

Bei der Bestimmung der Abhängigkeit der Na/K-Pumpe von der intrazellulären Na-Konzentration konnte in den meisten Untersuchungen an Herzpräparaten eine Sättigungskinetik festgestellt werden (Philipson & Nishimoto 1983, Gadsby & Nakao 1986, Schumacher 1986). In Untersuchungen an isolierten Ventrikelzellen des Meerschweinchens (Gadsby et al. 1985a) war dies nicht möglich. Auch die Meßwerte aus den Experimenten von Deitmer und Ellis (1978), Gadsby und Crane-field (1979), Eisner et al. (1981a) und Glitsch et al. (1982) deuten auf eine lineare Abhängigkeit der Pumpenaktivität von c'_{Na} . Die intrazelluläre Na-Konzentration konnte jedoch in den letztgenannten Untersuchungen nicht ausreichend erhöht werden. Da die Bestimmung der halbmaximalen Aktivierung durch c'_{Na} die Kenntnis der maximalen Aktivität voraussetzt, gibt es entsprechend wenig Angaben über $K_{0.5}$ -Werte.

1.7 Die Spannungsabhängigkeit des aktiven Na-Transportes am Herzen

Die Na/K-Pumpe des Herzens arbeitet elektrogen, d.h. sie erzeugt einen Auswärtsstrom (vergl. Page & Storm 1965, Glitsch 1969, Vassalle 1970). Aus diesem Grund sollte das Membranpotential einen Einfluß auf die Umsatzrate der Na/K-Pumpe, welche eine Nettoladung transportiert, haben.

An Purkinjefäden wurde zunächst in Potentialbereichen von -5 bis -100 mV keine oder nur eine geringe Spannungsabhängigkeit des Pumpenstromes gefunden (Isenberg & Trautwein 1974, Eisner & Lederer 1980a, Glitsch et al. 1982, Gadsby 1984). In Experimenten mit Membranpotentialen negativ von -100 mV zeigte sich eine deutliche Abnahme des Pumpenstromes (Glitsch et al. 1982, Hasuo & Koketsu 1985, Glitsch & Krahn 1986). An Herzeinzellen fanden Gadsby et al. (1985b) im Potentialbereich zwischen +60 und -140 mV einen maximalen Pumpenstrom bei positiven Membranpotentialen. Zu negativen Potentialen hin zeigt sich eine deutliche Abnahme der I_p -Amplitude mit einem extrapolierten Nullpunkt V_0 bei -155 mV.

Die Na/K-Pumpe hat nicht nur indirekt, durch Erzeugung und Aufrechterhaltung der Na- bzw. K-Konzentrationsgradienten, einen Einfluß auf das Membranpotential. Der elektrogene Na-Transport trägt auch direkt zum Ruhepotential der Herzzellen bei (Übersichten: Glitsch & Krahn 1986, Krahn 1986). Der Potentialbeitrag des elektrogenen Na-Transportes, d.h. die Größe der Hyperpolarisation, ist direkt proportional zum Membranwiderstand. Am Purkinjefaden des Schafherzens wurden Potentialbeiträge von ca. 10 mV (Eisner et al. 1984) und 5 mV (Glitsch & Krahn 1986) gemessen. Die Aktivität der Na/K-Pumpe hat zudem einen Einfluß auf das Aktionspotential. Eine Hemmung der Na/K-ATPase durch DHO führt am Herzen zu einer Verlängerung der Aktionspotentialdauer (Isenberg & Trautwein 1974). In umgekehrter Weise hat die Stimulierung des aktiven Transportes eine Verkürzung der Aktionspotentialdauer zur

Folge (Gadsby & Wit 1981). Die Größe der I_f -Amplitude beeinflusst auch die Schrittmacheraktivität von Herzzellen (Übersicht: Glitsch & Krahn 1986). Zur Abschätzung der Bedeutung des elektrogenen Na-Transportes für das Ruhe- und das Aktionspotential ist es wichtig die Spannungsabhängigkeit im physiologischen Potentialbereich zu kennen. Die Untersuchung der Pumpenstromamplitude in Abhängigkeit vom Membranpotential über diesen Bereich hinaus erlaubt außerdem den Vergleich mit errechneten Modellen für die Ionentranslokation durch den aktiven Transport. Aus solchen Vergleichen lassen sich Rückschlüsse auf die Anzahl spannungsabhängiger Teilreaktionen des aktiven Na-Transportes ziehen (vergl. Läger & Stark 1970, Hansen et al. 1981, Chapman et al. 1983, Chapman 1984, De Weer 1984, Läger & Apell 1986, 1988).

1.8 Untersuchung des aktiven Na-Transportes an isolierten Herzzellen

Bei der Untersuchung des aktiven Na-Transportes am Herzen war man lange Zeit auf multizelluläre Präparate angewiesen. Die Schwierigkeit in der elektrophysiologischen Untersuchung eines Gewebes besteht in der Kontrolle extra- und intrazellulärer Parameter. Da eine intrazelluläre Veränderung nur über Veränderung extrazellulärer Versuchsbedingungen vorgenommen werden kann, ist es oft unmöglich die Effektivität dieser Maßnahmen in allen Zellen des Gewebes zu überprüfen. Bei einem Standardpräparat der Herzmembranphysiologie, dem Purkinjefaden aus dem Reizleitungsgewebe des Warmblüterherzen, wurde aufgrund morphologischer Besonderheiten (Mobley & Page 1972) auch die quantitative Bestimmung von extrazellulären Parametern (z.B. K-Konzentration) erschwert. Fortschritte auf diesem Gebiet wurden durch die Isolierung von Herzzellen und die Entwicklung der Patch-clamp-Technik (Hamill et al. 1981) erzielt.

Cavanaugh (1955) beschrieb als erster die erfolgreiche Isolierung von Herzmuskelzellen aus Herzen von Hühnerembryonen. Eine Isolierung und Kultivierung

neonataler Zellen aus Rattenherzen gelang Harary und Farley (1960). Herzzellen aus Geweben adulter Tiere zu isolieren und kultivieren, ist aufgrund des wesentlich stärkeren Bindegewebes komplizierter. Außerdem sind adulte Herzzellen infolge einer verringerten Regenerationsfähigkeit schlechter zu kultivieren. Kono (1969), Berry et al. (1970) und Vahouny et al. (1970) publizierten die ersten Arbeiten über die Isolierung adulter Herzzellen.

Allen Herzzellisolierungen ist gemein, daß die Zellen durch eine Ca-freie extrazelluläre Lösung voneinander entkoppelt werden müssen. Das Bindegewebe wird durch entsprechende Enzyme gelöst und abgebaut. Danach können einzelne intakte Zellen in geeigneten physiologischen Medien kultiviert werden.

Bei der Patch-clamp-Technik werden im Gegensatz zu den konventionellen Glasmikroelektroden (Spitzendurchmesser: 0,1-1 μm) (Ling & Gerard 1949, Weidmann 1951) Glaskapillaren mit einem größeren Spitzendurchmesser (2-10 μm) verwendet. Die polierten Spitzen der Patch-clamp-Elektroden werden nicht in die Zelle eingestochen, sondern auf die Zellmembran aufgesetzt. Durch Anlegen eines Unterdruckes wird ein hoher Abdichtwiderstand zur Zellmembran erzielt. Die Zerstörung der Zellmembran unter der Pipettenspitze (Durchsaugen) ergibt einen Zugang zum Zellinneren (intrazelluläre Ableitung). Das geringe Zellvolumen im Vergleich zum Volumen der Patch-clamp-Elektrode und der relativ niederohmige Zugang (großer Spitzendurchmesser der Elektrode) sind die Ursache dafür, daß die Ionenkonzentrationen des Cytoplasmas infolge des Lösungsaustausches den Ionenkonzentrationen der Lösung in der Pipette rasch angeglichen werden. Auf diese Weise kann die intrazelluläre ionale Zusammensetzung kontrolliert und variiert werden (Brown et al. 1981a, b). Eine mehrfache Änderung der intrazellulären Lösung innerhalb eines Experimentes (interne Perfusion) ermöglicht die von Soejima und Noma (1984) beschriebene Technik. Die Konstanthaltung der Ionenkonzentrationen an der Außenseite der Zellmembran

bereitet an isolierten und kultivierten Einzelzellen keine nennenswerten Schwierigkeiten.

1.9 Aufgabenstellung

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sollen dazu beitragen, die Regulation der Aktivität der Na/K-Pumpe, welche von grundsätzlicher Bedeutung für die Lebensfähigkeit der meisten tierischen Zellen ist, besser zu verstehen. Speziell soll der Pumpenstrom (I_P) als Funktion der Konzentration intra- und extrazellulärer Kationen und des Membranpotentials untersucht werden. Fortschritte im Verständnis der Regulation der Na/K-ATPase geben dem Menschen vielleicht einmal die Möglichkeit, sinnvoll in den aktiven Na/K-Transport an Zellmembranen einzugreifen.

II. Material und Methoden

2.1 Isolierung und Kultivierung von Purkinjezellen aus dem Schafherzen

Die Purkinjezellen wurden aus Purkinjefasern, einem Teil des Reizleitungssystems des Säugetierherzens, isoliert. Purkinjefasern bilden die Endverzweigung dieses Systems, das den Übertritt der Erregung auf die Kammermuskulatur vermittelt. Die Leitungsgeschwindigkeit der Purkinjefasern ist schneller und ihre Kontraktilität geringer als die der Arbeitsmuskulatur.

Die Purkinjefasern wurden den Herzen frischgeschlachteter Schafe am örtlichen Schlachthof entnommen. Unabhängig vom Alter und Geschlecht der Tiere wurden Purkinjefasern des rechten und des linken Ventrikels mit einer Iridektomieschere vorsichtig aus den Herzen herausgeschnitten.

Der Transport der Fasern ins Labor erfolgte in einem Dewar-Gefäß (Volumen 0,75 l), in Sauerstoff (O_2) gesättigter Tyrodelösung (Tabelle 2, Lösung A) bei einer Temperatur von ca. 35°C. Um die Sauerstoffversorgung der Präparate sicherzustellen, wurde die Tyrodelösung während des Transportes mit Sauerstoff begast.

Im Labor wurden die Fasern in der gleichen, jedoch steril filtrierten Tyrodelösung erneut gespült und von anhaftenden Blutgerinnseln befreit. Alle anschließenden Arbeiten erfolgten aus Gründen der Sterilität in einem Reinluftraum (Laminaflow, Prettl LFR 80 VS 0615, Pfullingen, BRD) unter keimarmen Bedingungen mit steril-filtrierten Lösungen. Alle Lösungen wurden auf 37°C vorgewärmt, und ein Abkühlen wurde durch eine beheizbare Arbeitsfläche in dem Reinluftraum verhindert.

Die erste enzymhaltige Tyrodelösung (Tabelle 2, Lösung B) enthielt 1 mg/ml Protease (mit 15-25 % Calciumacetat als Verunreinigung, von *Streptomyces griseus* Typ XIV, P-5147, Sigma, St. Louis, MO, USA) und 1 mg/ml Rinderserumalbumin

(bovine serum albumin, BSA, A-6003, Sigma). Während der 20minütigen Protease-Behandlung wurde das die Purkinjezellen umgebende Bindegewebe angedaut, und der Durchmesser der Purkinjefaser nahm auf den doppelten Ausgangswert zu. Aus den Blutkapillaren, welche die Purkinjefasern durchziehen, trat gleichzeitig ein großer Teil des Blutes aus. Anschließend wurden die Purkinjefasern der 1. Petrischale (60x15 mm, Nr.3002, Falcon, Becton Dickinson, Oxnard, CA, USA) entnommen und in eine 2. Schale überführt, welche 10 ml einer nominell Ca-freien Tyrodelösung (Tabelle 2, Lösung C) mit 1 mM EGTA (Ethylenglycol-bis(2-aminoethyl)-tetraessigsäure, Serva, Heidelberg, BRD) enthielt. In dieser Lösung wurde das angedaute Gewebe für ca. 20 Minuten einer freien Ca-Konzentration von weniger als 10^{-8} M ausgesetzt. Die darauffolgende Behandlung der Fasern in einer 3. Petrischale mit 10 ml einer Ca-freien Tyrodelösung (Tabelle 2, Lösung D) mit Collagenase ("Worthington" CLS II, seromed, Biochrom, Berlin, BRD) als wichtigstem Bestandteil führte zu einer weiteren Trennung der Purkinjezellen. Außerdem enthielt Lösung D EGTA, eine Ca-freie Protease (Typ XXVII, P-4789, Sigma) und Elastase (aus Schweinepankreas, Serva).

Nach 60 Minuten wurde in 7 Schritten von je 20 Minuten Dauer stufenweise die Ca-Konzentration erhöht und die Enzymkonzentration verringert, indem die Enzymlösung D nach und nach durch ein Gemisch aus Ca-freier Tyrodelösung mit BSA (Tabelle 2, Lösung E) und Kulturmedium (Lösung F) ersetzt wurde. Im letzten Schritt wurden die Fäden in eine 4. Petrischale überführt, welche je 5 ml von Lösung E und Lösung F enthielt. In dieser Lösung (E + F) wurden die Fasern auf eine Länge von 10-15 mm zurechtgeschnitten. Je eine Faser wurde mit einer feinen Dumont-Pinzette in der Mitte gefaßt und in ein Petrischälchen (35x10 mm, Nr.1008, Falcon, Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ, USA) mit 3 ml Kulturmedium (Lösung F) überführt.

Mit einem kleinen Spatel wurden die isolierten Purkinjezellen aus den 0,3-1,5 mm breiten, bindegewebigen

Schläuchen herausgestrichen. Teilweise gleichzeitig austretende Blutreste und Zelltrümmer wurden mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und verworfen. Durch vorsichtiges Schwenken des Kulturschälchens verteilten sich die Zellen gleichmäßig in der Mitte des Schälchens. Je nach Größe der Purkinjefaser erhielt man so pro Kulturschälchen 100-1000 Einzelzellen. Pro Zellisolierung wurden 15-20 Kulturen hergestellt. Diese wurden in einem CO₂-Inkubator (Heraeus B5006, Hanau, BRD) bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 2 % CO₂ aufbewahrt. Zweimal pro Woche wurde während der Kultivierung das Kulturmedium durch frisches Medium ersetzt.

Tabelle 2: Lösungen für die Zellisolierung und Zellkultivierung

Lösung		A	B	C	D	E
NaCl	(mM)	137	137	137	137	137
KCl	(mM)	5,4	5,4	5,4	5,4	5,4
HEPES	(mM)	10	10	10	10	10
MgCl ₂	(mM)	1	1	1	1	1
CaCl	(mM)	1,8	0,9-1,6	-	-	-
Glucose	(mM)	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5
EGTA	(mM)	-	-	1	0,2	-
Protease mit Ca	(mg/ml)	-	1	-	-	-
Protease ohne Ca	(mg/ml)	-	-	-	0,2	-
Collagenase	(mg/ml)	-	-	-	0,5	-
Elastase	(mg/ml)	-	-	-	≈0,2*	-
BSA	(mg/ml)	-	1	-	1	1
pH-Wert		7,4	7,4	7,4	7,4	7,4

* 10 µl Suspension/ml = 0,192 mg/ml

HEPES (N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure)

Lösung F

Das Kulturmedium F bestand zu zwei Dritteln aus Wissler (BM86-Wissler mit NaHCO_3 und Glutamin, Boehringer Mannheim, BRD) und zu einem Drittel aus M199 (Medium 199 mit 25 mM HEPES, Hanks Salzen und L-Glutamin, Gibco, Paisley, Schottland). Dem Gemisch der beiden käuflichen Kulturmedien wurden 5 % fetales Kälberserum (foetal calf serum, FCS, Gibco) zugegeben. Vor dem Mischen wurde dem Wissler-Medium HEPES (Endkonzentration: 5 mM) aus einer steril-filtrierte 1 M Stammlösung beigegeben. Da die Purkinjefasern am örtlichen Schlachthof nicht unter sterilen Bedingungen präpariert werden konnten, enthielten alle Lösungen (A - F) Antibiotika zur Unterdrückung der Vermehrung von Bakterien und Hefepilzen. Den Lösungen wurden jeweils 10 mg/ml der Breitbandantibiotika Kanamycin (K0877, Sigma) und Gentamycin (No16-760-15, Flow Laboratories, Irvine, Schottland) zugegeben.

2.2 Lösungen für Patch-clamp-Experimente

2.2.1 Lösungen für die Bestimmung der Abhängigkeit der Na/K-Pumpe von der intrazellulären Na-Konzentration

Die externe Lösung setzte sich zusammen aus: 10 RbCl, 5 CsOH, 50 NaCl, 50 NaOH, 3 MgCl_2 , 2 BaCl_2 , 0,9 CaCl_2 , 0,1 CdCl_2 , 110 HEPES, 5 Glucose, (alle Angaben in mM), pH 7,4. Außer Rubidium wurden in einzelnen Versuchsreihen Cs- und K-Ionen zur Aktivierung der Na/K-Pumpe verwendet. Die Ba- und Cd-Ionen unterdrücken Ionenleitfähigkeiten der Zellmembran und ermöglichen dadurch eine genauere Messung des Pumpenstromes. Die externe Lösung in der Anblaspipette enthielt zusätzlich 4 bis $8 \cdot 10^{-4}$ M Dihydro-g-strophanthin (Dihydroouabain, DHO), einen spezifischen Hemmstoff der Na/K-Pumpe. Das Pharmakon wurde der Lösung kurz vor Versuchsbeginn aus einer wässrigen 10^{-2} M Stammlösung zugesetzt.

Die Standardpipettenlösung (interne Lösung) hatte folgende Zusammensetzung: 75 CsOH, 5 MgCl_2 , 30 HEPES, 6 EGTA, 25

Na₂KrP (Na₂-Kreatinphosphat), 6 MgATP, 40 Glucose (alle Angaben in mM). Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit HCl. Bei der Verwendung geringerer Na-Konzentrationen wurde die Konzentration von Na₂-Kreatinphosphat gesenkt und die Konzentrationen von Cs, HEPES und Glucose erhöht, um eine konstante Osmolarität und Cl-Konzentration zu gewährleisten. Ein Absenken der Kreatinphosphat-Konzentration bei konstanter Na-Konzentration hatte in Kontrollexperimenten keinen Einfluß auf den Membranstrom.

2.2.2 Lösungen für die Bestimmung der Abhängigkeit der Na/K-Pumpe von der intra- bzw. extrazellulären Mg-Konzentration

Die Cs-haltige Badlösung unterschied sich von der Cs-freien Lösung (in Klammern) folgendermaßen: 16 CsOH (0), 50 NaCl, 40 NaOH (50), 5 BaCl₂, 0,9 CaCl₂, 112 HEPES (100), 14 Glucose (32), (alle Angaben in mM), pH 7,4. Damit kein Mg über die Zellmembran in die Zelle gelangen konnte, wurde Mg-freie externe Lösung verwendet. In Kontrollexperimenten wurde bei konstanter Konzentration an Cl⁻ und zweiwertigen Kationen BaCl₂ von 5 auf 2 mM gesenkt und zusätzlich 3 mM MgCl₂ gegeben.

In der Patch-clamp-Pipette wurden ebenfalls zwei verschiedene Lösungen verwendet, eine Mg-haltige und eine Mg-freie (in Klammern). Zusammensetzung: 6 MgCl₂ (0), 82 CsOH (92), 10 NaOH (0), 0 CsCl (12), 96 HEPES, 4 EGTA, 2 CDTA (trans-1,2-Diamino-cyclohexan-N,N,N',N'-tetraessigsäure), 10 Na₂KrP, 5 MgATP (5 Na₂ATP), 6 Glucose (5), (alle Angaben in mM). Mit HCl wurde ein pH-Wert von 7,4 eingestellt. CDTA (2 mM) wurde in einigen Versuchen durch EGTA oder EDTA (Ethylendiamin-tetraessigsäure) ersetzt.

2.2.3 Lösungen für die Bestimmung der Abhängigkeit der Na/K-Pumpe von der extrazellulären K- bzw. Cs-Konzentration

Die Standardlösung für die externe Perfusion enthielt, 40 NaCl, 60 NaOH, 3 MgCl₂, 2 BaCl₂, 0,9 CaCl₂, 120 HEPES, 4 Glucose, (alle Angaben in mM), pH 7,4. Zusätzlich

enthielten alle externen Lösungen zusammen 20 mM [KCl (oder CsCl) plus TEACl (Tetraethylammoniumchlorid)], um die extrazelluläre Cl-Konzentration bei unterschiedlichen Konzentrationen der Aktivator-kationen K und Cs konstant zu halten. KCl, CsCl und TEACl wurden den externen Lösungen aus 1 M Stammlösungen (gelöst in der genannten Standardlösung) zugegeben. Die Endkonzentrationen variierten zwischen 0 und 20 mM KCl bzw. CsCl und für TEACl entsprechend zwischen 20 und 0 mM. Die Anblaspipette enthielt externe Lösung mit 10 mM KCl plus 10 mM TEACl oder 20 mM CsCl. Am Ende eines jeden Experimentes wurde der jeweils fließenden externen Lösung DHO aus einer 10^{-2} M Stammlösung zugegeben (Endkonzentration $2 \cdot 10^{-4}$ M DHO).

Die Pipettenlösung setzte sich zusammen aus: 120 CsOH, 5 MgCl_2 , 120 HEPES, 6 EGTA, 6,5 $\text{Na}_2\text{K}_2\text{P}$, 5 MgATP, 7 Glucose, (alle Angaben in mM). Der pH-Wert von 7,4 wurde mit HCl eingestellt.

2.2.4 Lösungen für die Bestimmung der Spannungsabhängigkeit der Na/K-Pumpe

Die verwendeten Lösungen waren mit den in Abschnitt 2.2.1 genannten identisch. Lediglich für die Variation des Cs-Gradienten wurden folgende externe Lösungen eingesetzt, mit 6 mM Cs und 40 mM Cs (in Klammern): 6 CsOH (40), 50 NaCl (80), 50 NaOH (20), 3 MgCl_2 , 2 BaCl_2 , 0,9 CaCl_2 , 112 HEPES (120), 14 Glucose (1), (alle Angaben in mM), pH 7,4.

2.3 Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau befand sich zur Abschirmung von elektrischen Störsignalen in einem Faraday-Käfig, unter Ausnahme der mit Netzspannung betriebenen Geräte. Die elektrophysiologischen Untersuchungen der Purkinjezellen wurden unter optischer Kontrolle mit Hilfe eines Umkehrmikroskopes (Zeiss IM35, Oberkochen, BRD) durchgeführt. Dazu wurde ein Kulturschälchen auf dem Objektträgertisch befestigt und an eine Durchflußapparatur angeschlossen.

Der zuführende Teil der Durchflußapparatur bestand aus einer Rollenspumpe (Desaga, Heidelberg, BRD), welche aus einem Vorratsgefäß 0,3-0,5 ml Lösung pro Minute durch einen Tropfentrenner zu einem Peltier-Element (Conrad Elektronik, Hirschau, BRD) beförderte. Da die Lösung in mehreren Schleifen über die Oberseite des Peltier-Elementes geführt wurde, konnte die Temperatur der durchfließenden Lösung über die Temperatur des Peltier-Elementes konstant gehalten werden. Der Kontakt der 10 cm langen Schleifen aus rostfreiem Edelstahl zur Oberseite des Peltier-Elementes wurde durch Wärmeleitpaste verbessert. Um ständige, kleine Temperaturschwankungen zu vermeiden, wurde das Peltier-Element nicht in einem Rückkopplungskreis mit einem Wärmefühler betrieben, sondern mit einem konstanten Strom. Außerdem wurde ein kleiner Messingblock zwischen den Edelstahlschleifen und der Oberseite des Peltier-Elementes befestigt, um als Wärmespeicher zu dienen. Da ein Peltier-Element auf der einen Seite Wärme und auf der gegenüberliegenden Seite Kälte erzeugt, wurde zum Zwecke des schnelleren Temperatúrausgleiches die Unterseite des Elementes über Wärmeleitpaste mit dem Mikroskopisch verbunden.

Vor jedem Experiment wurde die Temperatur in der Versuchskammer gemessen und auf einen Wert zwischen 30 und 33°C eingestellt. Eine Temperierung der Versuchskammer ist aufgrund der Temperaturabhängigkeit des aktiven Na-Transportes (Glitsch & Pusch 1984) erforderlich. Die Versuchskammer in Abb. 3 bestand aus einem Plexiglasring, der in das Kulturschälchen mit den Zellen gepreßt wurde, um das Badvolumen von ca. 3 ml auf ca. 1 ml zu verringern. Außer einem kreisförmigen Ausschnitt hat die Versuchskammer je ein kleines Reservoir am Zu- und Ablauf. Das Reservoir des Zulaufes ist in Abb. 3B im linken Teil angeschnitten. Die gestrichelt dargestellte Kante am inneren Rand des Schälcheneinsatzes führte zu einem gleichmäßigen Lösungsfluß. Der Zulauf erfolgte über einen 5 cm langen Teflonschlauch vom Peltier-Element aus und der Ablauf über eine speziell gebogene Glaskapillare. Diese Kapillare war über einen Schlauch und einen zwischengeschalteten

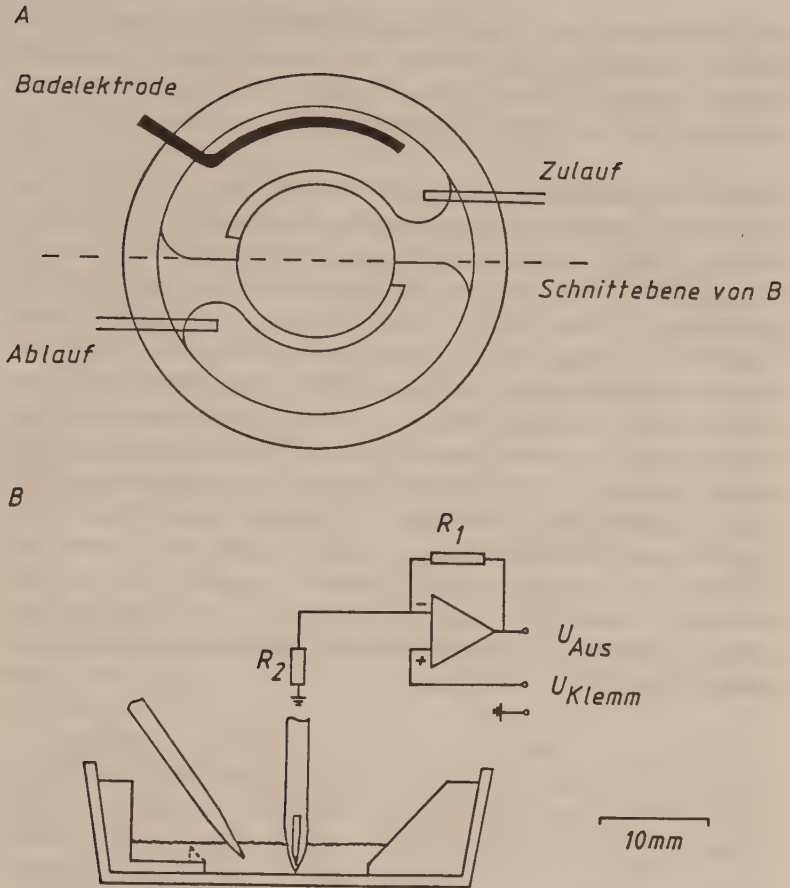


Abb.3 Versuchsaufbau (maßstabgerechte Zeichnungen).

A. Der Kulturschälcheneinsatz in der Aufsicht mit eingezeichneter Position für die Badelektrode, den Zulauf und den Ablauf.

B. Der Kulturschälcheneinsatz im Querschnitt mit eingezeichneter Position für die Anblaspipette (links) und die Patch-clamp-Elektrode. In der Patch-clamp-Elektrode ist die Position der Füllpipette angedeutet. Über dem Querschnitt befindet sich ein vereinfachtes elektrisches Ersatzschaltbild des Voltage-clamp-Aufbaus.

Tropfentrenner mit einer Wasserstrahlpumpe verbunden, so daß die Badlösung auf einem bestimmten Niveau abgesaugt wurde. Dieses Niveau ließ sich variieren, da die Glaskapillare an einem Kugelgelenk befestigt war.

In der Versuchskammer wurden zwei Elektroden mit der Hilfe von einem Paar Mikromanipulatoren (MO-103, Narishige, Tokio, Japan) positioniert. An dem Kopf des rechten Mikromanipulators war der Vorverstärker des Patch-clamp-Verstärkers (L/M EPC-7, List-Medical, Darmstadt, BRD) befestigt. Die Arretierung des Elektrodenhalters (mit der Patch-clamp-Elektrode) erfolgte über die BNC-Buchse des Vorverstärkers (siehe Abb. 4). Die Patch-clamp-Elektrode wurde unter optischer Kontrolle mit der Einzelzelle in Kontakt gebracht. Am Kopf des linken Mikromanipulators war eine Glaskapillare befestigt, in deren eines Ende eine Anblaspipette gesteckt wurde. An dem anderen Ende wurde ein Schlauch aufgesteckt. Über diesen Schlauch konnte ein Überdruck appliziert werden, so daß an der Spitze der Anblaselektrode jene Lösung austrat, mit der die Elektrode gefüllt war.

Der Elektrodenhalter für die Patch-clamp-Elektrode (Abb. 4) ist eine Eigenentwicklung. Er ermöglicht Messungen mit mehreren internen Lösungen an derselben Einzelzelle. Das Verfahren, das Cytoplasma einer Einzelzelle gegen mehrere interne Lösungen auszutauschen und so z.B. interne Ionenkonzentrationen zu variieren, bezeichnet man als interne Perfusion (vergl. Soejima & Noma 1984). Der Elektrodenhalter hat einen BNC-Stecker, der in die BNC-Buchse des Patch-clamp-Vorverstärkers gesteckt wird. Der innere Stift des BNC-Steckers ist über einen chlorierten Silberdraht mit der internen Lösung in der Patch-clamp-Pipette verbunden.

Sobald eine Einzelzelle an der Spitze der Pipette angesaugt und das Membranareal unter der Pipettenspitzenöffnung durchgesaugt worden war, konnten elektrische Signale der Einzelzelle über eine interne Lösung in der Pipette und den chlorierten Silberdraht zum Verstärker fortgeleitet werden. Um nach einem einmaligen Austausch des Cytoplasmas gegen

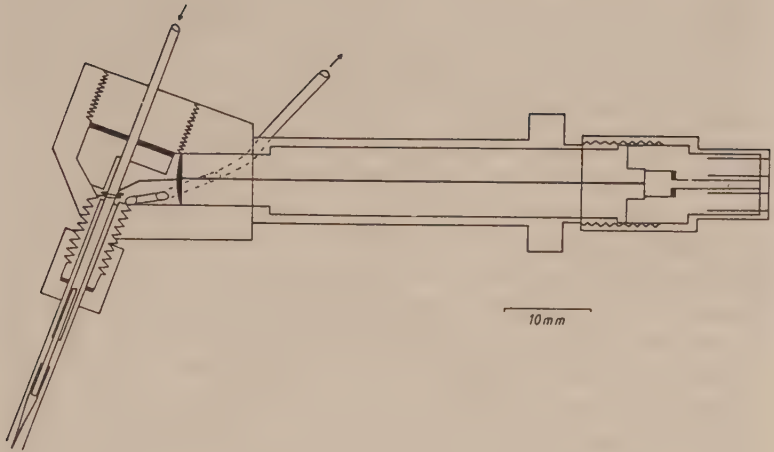


Abb.4 Maßstabgerechter Längsschnitt durch den Patch-clamp-Elektrodenhalter für eine mehrfache interne Perfusion (Eigenentwurf).

Der linke Teil der Abbildung wird als Kopf bezeichnet. Er enthält die verschiebbare Füllpipette, das Ende des Ag/AgCl-Drahtes und nimmt die Patch-clamp-Elektrode (nur angedeutet) auf. Die kleinen Pfeile verdeutlichen die Flußrichtung während des Lösungsaustausches.

Am mittleren Teil ist ein kleiner Tropfentrenner befestigt (nicht dargestellt).

Der rechte Teil entspricht dem Längsschnitt durch einen Bajonett-Norm-Connektor-Stecker (BNC-Stecker), über den die mechanische Befestigung und die Herstellung des elektrischen Kontaktes zum Verstärkerkopf (BNC-Buchse) erfolgt.

die interne Lösung die Wirkung weiterer interner Lösungen testen zu können, enthielt der Elektrodenhalter noch eine interne Füllpipette. Die Füllpipetten wurden aus den Kunststoffkapillaren von Wattestäbchen (Jean Carol, W. Pelz GmbH & Co, Wahlstedt, BRD) über einer Kerze gezogen und so zurechtgeschnitten, daß sie einen Öffnungsdurchmesser von ca. 60 μm hatten und mit ihrem Ende auf eine Kanüle (Nr. 18, Außendurchmesser ca. 0,5 mm) geklebt werden konnten. Die Kanüle wurde in einen harten Teflonschlauch gesteckt, welcher über einen weichen Polyethylenschlauch mit einem Reservoir für interne Lösungen verbunden war. Das ganze System wurde über gefettete Gummiringe abgedichtet und war daher frei verschiebbar. Auf diese Weise konnte die Füllpipette bis auf 500 μm an die Spitze der Patch-clamp-Elektrode und somit an die Zelle herangebracht werden. Spitzere Füllpipetten mit Innendurchmessern kleiner als 40 μm , die es zuließen, die Füllpipette noch weiter in die Spitze der Patch-clamp-Elektrode zu schieben, hatten den Nachteil, daß sie einen zu großen Unterdruck beim Ansaugen neuer interner Lösungen erforderten.

Die alte interne Lösung wurde über einen Teflonschlauch im Kopf des Elektrodenhalters am Ende der Patch-clamp-Pipette abgesaugt. Direkt am Elektrodenhalter war ein kleiner Tropfentrenner befestigt, der den Lösungsfluß der abgesaugten Lösung unterbrach und so das Auffangen von Störsignalen durch die interne Lösung im Schlauch verhinderte. Der kleine Tropfentrenner war mit einem ca. 30 cm entfernten großen Tropfentrenner verbunden, in dem die interne Lösung gesammelt wurde. An diesen Tropfentrenner konnte ein Unterdruck angelegt werden, der dafür verantwortlich war, daß aus einem wechselbaren Reservoir neue interne Lösung über die Füllpipette in die Patch-clamp-Elektrode strömte. Die alte interne Lösung wurde durch die neue, nachströmende Lösung verdrängt und ersetzt. Danach konnte die Lösung in der Zelle mit der neuen Lösung äquilibrieren. Das Volumen der Einzelzelle war dabei vernachlässigbar gering, da das Volumen der internen Lösung in der Patch-clamp-Elektrode mehr als ein millionenmal größer ist.

Bei dem Patch-clamp-Verstärker handelte es sich, stark vereinfacht gesehen, um einen Operationsverstärker in einem hochohmigen Rückkopplungskreis (R_1 in Abb. 3 = $0,5 \text{ G}\Omega$, bei Ganzzellableitung). Seine Funktionsweise ist mit der eines sehr empfindlichen Stromspannungswandlers zu vergleichen. Aus Membranstromänderungen resultierten verstärkte Spannungssignale, die zur Anzeige direkt auf einen Oszillographen und zur Registrierung auf einen 2-Kanal Schreiber (Serie P50, Rikadenki Kogyo Co., Tokio, Japan) gegeben wurden. Der zweite Kanal des Schreibers diente der Registrierung des Haltepotentials (V_c). Eine Variation von V_c war möglich über die Vorgabe einer Spannung (U_{Klemm}) auf den positiven Eingang des Operationsverstärkers. Da das Potential am positiven und negativen Eingang des Operationsverstärkers immer gleich ist, wurde so eine neues Haltepotential erzeugt. Diese Spannung am negativen Eingang war bis zur Pipettenspitze konstant, von wo aus sie über verschiedene Widerstände abfiel. Um Rückschlüsse auf Änderungen des Membranwiderstandes ziehen zu können, mußte der in Serie geschaltete Pipettenwiderstand vergleichsweise gering und der parallel geschaltete Abdichtwiderstand vergleichsweise hoch sein. Der Gesamteingangswiderstand R_2 setzte sich zusammen aus dem Pipettenwiderstand (R_{Pip}), dem Abdichtwiderstand (R_{Abd}) und dem Membranwiderstand der Zelle (R_{Mem}).

$$R_2 = R_{Pip} + \frac{1}{1/R_{Abd} + 1/R_{Mem}} \quad (3)$$

Vor dem Kontakt der Patch-clamp-Pipette mit einer Zelle war R_2 ungefähr gleich R_{Pip} , da alle anderen Widerstände sehr klein waren. Während des Experimentes waren der Abdichtwiderstand und der Membranwiderstand sehr viel größer als der Pipettenwiderstand. Der Abdichtwiderstand mußte auch wesentlich größer als der Membranwiderstand sein, so daß R_2 im Wesentlichen durch R_{Mem} bestimmt wurde.

2.4 Versuchsdurchführung

Vor dem Beginn eines Experimentes wurden die Anblaselektroden auf einem Mikroelektrodenziehgerät (Patch-Electrode-Puller, Ochotzki, Homburg, BRD) aus Pyrexglas (Außendurchmesser: 1,5 mm, Hilgenberg, Malsfeld, BRD) gezogen. Die Patch-clamp-Elektroden wurden auf dem gleichen Gerät aus gereinigten Sodaklarglas-Kapillaren (Außendurchmesser: 2 mm, Innendurchmesser: 1,6 mm, Hilgenberg) gezogen. Die Glaskapillaren für die Patch-clamp-Elektroden wurden in einem Gemisch (3 : 1) aus Ethanol (C_2H_5OH) und 65 %iger Salpetersäure (HNO_3) gereinigt, mit destilliertem Wasser gespült und bis zu ihrer Anwendung darin aufbewahrt. Für die Herstellung der Patch-clamp-Elektroden wurde das weichere Sodaklarglas verwendet, damit Pipetten mit einem kurzen Schaft und einer stumpf zulaufenden Spitzen gezogen werden konnten. Die Spitzen der Patch-clamp-Elektroden wurden sofort nach dem Ziehen unter optischer Kontrolle (Mikroskop ACM, Zeiss, Oberkochen, BRD) mit Hilfe eines glühenden Heizdrahtes erhitzt. Die schmelzende Pipettenspitze verringerte ihren Öffnungsdurchmesser und bekam eine glatte Oberfläche, wie sie zur Herstellung eines hohen Abdichtwiderstandes zwischen der Zellmembran und der Elektrode notwendig ist. Die so hergestellten Patch-clamp-Elektroden hatten mit den verwendeten intrazellulären Lösungen einen Widerstand von 1 bis 8 M Ω . Für Versuche mit interner Perfusion wurden nur Elektroden mit einem Widerstand von 1 bis 4 M Ω verwendet.

Die Anblaspipetten und die Patch-clamp-Elektroden wurden in die entsprechenden Lösungen getaucht und zunächst von der Spitze her gefüllt. Das luftblasenfreie Füllen der Elektroden erfolgte direkt vor ihrer Verwendung mit Hilfe von Spritzenkanülen vom stumpfen Ende aus. Die Anblaspipette wurde mit Zahnwachs in ihrer Halterung fixiert. Die Patch-clamp-Elektrode wurde, über einen Schraubmechanismus unter Verwendung einer Gummidichtung als Quetschring, in dem Elektrodenhalter befestigt und abgedichtet.

Nachdem das Kulturschälchen mit durchschnittlich einigen hundert Einzelzellen auf dem Objektträgertisch angebracht war, wurde die Anblaspipette positioniert und ihre Funktion durch Applikation von Überdruck geprüft. Durch vorsichtiges Aufsetzen der Pipette auf den Schälchenboden konnte die Spitze abgebrochen und auf den gewünschten Öffnungsdurchmesser von ca. 10 μm gebracht werden. Danach wurde die Anblaspipette in eine Warteposition am Rande des Kulturschälchens gebracht.

Sobald die Patch-clamp-Elektrode mit dem Vorverstärker in Verbindung gebracht und in die Lösung des Kulturschälchens eingetaucht war, konnte ihr Widerstand mit Hilfe eines Spannungspulses festgestellt werden. Der Spannungspuls wurde von einem Reizgerät (Grass S44 Stimulator, Grass Instruments, Quincy, USA) geliefert und der resultierende Strompuls nach der Verstärkung durch den Patch-clamp-Verstärker auf einem Oszillographen (Tektronix 5111A, Tektronix, Beaverton, USA) angezeigt. Danach wurde die Patch-clamp-Elektrode mit einem Mikromanipulator über der zu untersuchenden Einzelzelle positioniert und die Zelle vorsichtig angesaugt, bis sich der aus dem konstanten Spannungspuls resultierende Strompuls deutlich verringerte. Durch vorsichtiges Ansaugen der Zelle wurde der Abdichtwiderstand bis in den Gigaohm-Bereich erhöht. Häufig ergaben sich bei der Berührung der Zelle auch spontan Abdichtwiderstände von mehreren Gigaohm, sogenannte giga-seals. Die Häufigkeit solch hoher Abdichtwiderstände wurde durch Verwendung filtrierter Pipetten- und Badlösungen erhöht. Sobald ein Abdichtwiderstand von mehreren Gigaohm erzielt worden war, konnte durch eine weitere Erhöhung des Unterdruckes in der Patch-clamp-Elektrode das Membranareal unter der Elektrodenspitze durchgesaugt werden. Auf diese Weise wurde ein Kontakt zum Zellinneren und damit auch zu der gesamten restlichen Zellmembran hergestellt. Als Indiz für einen niederohmigen Zugang zum Zellinneren diente die Messung des schnellen Na-Einstromes (I_{Na}) und seiner Potentialabhängigkeit (siehe Abb. 5). Dauerten die Aktivierung und Inaktivierung des Na-Stromes nur wenige Millisekunden und zeigten beide einen

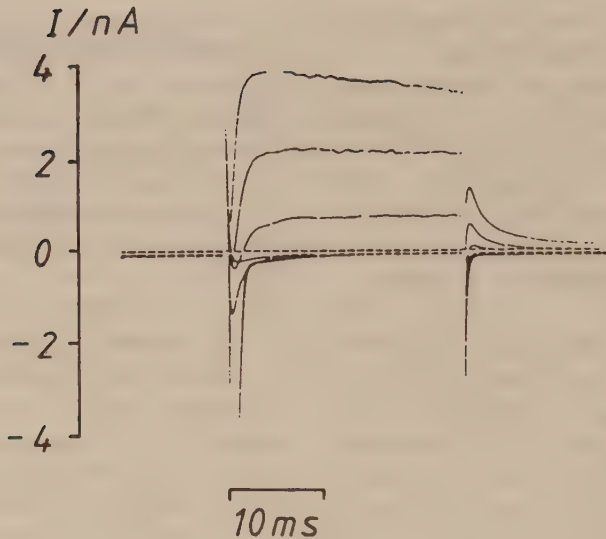


Abb.5 Aktivierung von I_{Na} direkt nach dem Durchsaugen der Zellmembran.

Fotographie einer Originalregistrierung auf einem Speicheroszillographen (Tektronix 5111A, Tektronix, Beaverton, USA). Die interne und externe Lösung entspricht bis auf die intrazelluläre Ca-Pufferung durch EGTA weitgehend den physiologischen Bedingungen. Es wurden jeweils ca. 25 ms-dauernde Spannungspulse gegeben, welche die Zellmembran um 40 mV depolarisierten. Das Haltepotential wurde in sechs 10 mV-Schritten von -15 auf -65 mV verändert. Die entsprechenden Stromregistrierungen sind von oben nach unten angeordnet. Bei Spannungspulsen auf +25 mV (-15 mV plus 40 mV depolarisierend), +15 und +5 mV wird nach einem kurzen einwärtsgerichteten Strom ein großer Auswärtsstrom registriert. Ausgehend von einem Haltepotential von -45 mV ergibt sich keine nennenswerte Stromveränderung. Negativ von -50 mV (-55 und -65 mV) kommt es durch einen depolarisierenden Puls zu einer Aktivierung des Na-Stromes. Der schnelle Na-Einstrom ist in dem gezeigten Experiment bereits nach 3 ms wieder vollständig inaktiviert. T: 32°C.

gleichförmigen Verlauf, so bestand ein guter Zugang zum Zellinneren. In allen Versuchen wurde der schnelle Na-Einstrom vom Beginn bis zum Ende eines Versuches mehrmals kontrolliert. Die Überprüfung der Potentialabhängigkeit von I_{Na} stellte gleichzeitig eine Funktionskontrolle der Spannungsklemme und die Kontrolle einer physiologischen Eigenschaft der isolierten Einzelzelle dar. Der Schrittmacherstrom wurde gewöhnlich durch Cs^+ in der externen Lösung blockiert oder die Strommessungen erfolgten in einem Potentialbereich, in dem dieser Strom nicht aktiviert ist.

Die Ableitkonfiguration, in der der Strom über die gesamte Zellmembran gemessen wird, nennt man Ganzzellableitung (whole cell recording, WCR) (Hamill et al. 1981). Die WCR ermöglicht bei entsprechend kleinen Zellen Membranstrommessungen bei geklemmtem Membranpotential. Mit dem Durchsaugen der Zellmembran beginnt auch der Austausch des Cytoplasmas gegen die interne Pipettenlösung. Die Dauer dieses Prozesses ist abhängig von dem Elektrodenwiderstand, der Größe und Form der Zelle sowie der Beschaffenheit der gelösten Substanzen in der internen Lösung. Die Zeit bis zum Lösungsausgleich variierte in den im folgenden beschriebenen Versuchen zwischen 3 und 6 Minuten.

Das Verfahren der internen Perfusion ermöglichte es, die interne Lösung wiederholt zu wechseln. Dazu mußte zunächst der Lösungsweg zu einem Reservoir mit neuer interner Lösung freigegeben werden. Der Schlauch in das genannte Reservoir wurde bis zu diesem Zeitpunkt mit einer kleinen Arterienklemme abgeklemmt, damit bei der anfänglichen Unterdruckapplikation die Zellmembran durchgesaugt und nicht bereits neue interne Lösung angesaugt wurde. Nach dem Entfernen der Klemme konnte durch geringen Unterdruck neue Lösung in die Pipettenspitze gebracht werden. Bei Füllpipettenspitzen mit einem Öffnungsdurchmesser von mehr als 100 μm lief die neue Lösung meist spontan, aufgrund der Kapillarkräfte und des Höhenunterschiedes (ca. 25 cm) zwischen dem Reservoir und dem auffangenden Tropfentrenner.

Variationen der externen Lösung konnten ebenfalls durch Umhängen auf ein anderes Reservoir vorgenommen werden oder aber kurzfristig durch den Einsatz der Anblaspipette. Dazu wurde die Anblaspipette aus ihrer Warteposition bis auf einen Zelldurchmesser (ca. 50 μm) an die untersuchte Zelle herangebracht. Befand sich die Pipettenspitze nun etwas oberhalb der Focusebene der Zelle, konnte durch Anwendung von Druck externe Lösung angeblasen werden. Dieses Vorgehen war geeignet, sehr schnell Testlösungen an eine Zelle zu bringen und wieder abzuspülen. Es wurden nur geringe Lösungsmengen benötigt, und die anderen Zellen in dem Kulturschälchen blieben unbeeinflusst.

Das Umschalten der ständig fließenden externen Lösung auf eine andere Lösung war wesentlich zeitaufwendiger. Es vergingen ca. 2 Minuten bis die neue Lösung in der Versuchskammer ankam und 2 bis 4 weitere Minuten bis das Bad ausreichend durchspült war. Außerdem ließen sich maximal wirksame Konzentrationen eines Pharmakons (z.B. Herzglykoside) nur sehr langsam wieder auswaschen. In solchen Fällen mußte das Experiment meist beendet werden, bevor das Pharmakon vollständig ausgewaschen war.

Änderte sich die Leitfähigkeit der Zellmembran bei konstantem Membranpotential in einem Zeitraum von 20-100 Minuten nur unwesentlich, so waren die entsprechenden Versuche für eine Auswertung geeignet. Als Maß für die Aktivität der Na/K-Pumpe wurde die Größe des DHO-sensitiven Auswärtsstromes genommen.

2.5 Auswertung

Potential- und Stromänderungen konnten aus den Schreiberregistrierungen direkt abgelesen und ausgewertet werden. Untersuchungen von Leitfähigkeitsänderungen und Potentialabhängigkeiten von Membranstromkomponenten erforderten die Aufnahme von Strom-Spannungs-Beziehungen (I-V-Beziehungen). Zur Erstellung von I-V-Beziehungen wurden die jeweils fließenden Klemmströme am Ende eines 800 ms-dauernden Spannungspulses gegen das entsprechende

Haltepotential aufgetragen (vergl. Abb. 25). Dabei wurden die Spannungspulse von einem konstanten Haltepotential aus, in einem Potentialbereich von -130 bis +20 mV, zunächst in depolarisierende und dann in hyperpolarisierende Richtung gegeben (Abb. 24). Gegen Ende des Pulses befanden sich die Membranstromkomponenten meist in einem steady-state.

Um die gemessenen Stromwerte als Stromdichten angeben zu können, mußten die Oberflächen der Einzelzellen bestimmt werden. Es standen zwei grundsätzlich verschiedene Methoden zur Verfügung.

Die Oberfläche der Einzelzelle kann aus einer Kapazitätsmessung berechnet werden. Dazu wird unter Verwendung eines konventionellen Mikroelektrodenhalters (vergl. Hamill et al. 1981), mit einer geringen Eigenkapazität, vor dem Durchsaugen der Zellmembran eine Kapazitätskompensation an dem Patch-clamp-Verstärker vorgenommen. Der Betrag, um den die Kapazitätskompensation direkt nach dem Durchsaugen korrigiert werden muß, entspricht der Kapazität der Zellmembran. Unter der Annahme, daß die Membrankapazität $1 \mu\text{F} \cdot \text{cm}^{-2}$ beträgt (Mobley & Page 1972), läßt sich so die Zelloberfläche berechnen.

Die Oberfläche der verwendeten Einzelzellen kann auch geometrisch bestimmt werden, da die Zellen meistens eine Kugel- oder Zylinderform haben. Wurden eine reguläre geometrische Form und eine glatte Zelloberfläche (vergl. Abb. 8A) vorausgesetzt, konnte aus den optisch bestimmten Maßen die Oberfläche berechnet werden.

Beide Methoden wurden jeweils an denselben 10 Zellen getestet und verglichen. Die Oberfläche aus der kapazitiven Bestimmung ergab dabei einen Wert von $0,97 \pm 0,16$, wenn der Wert aus der geometrischen Bestimmung der jeweiligen Zelle gleich 1 gesetzt wurde. Zur Bestimmung der Membranstromdichte wird im folgenden die geometrische Oberflächenbestimmung am Ende eines erfolgreichen Experimentes verwendet.

In einigen Fällen wurde zur Abschätzung der Anzahl von Bindungsstellen einiger aktivierender Kationen an der Na/K-Pumpe ein Hill-Diagramm angefertigt und der Hill-Koeffizient n_H bestimmt. Bei einer geringen Kooperativität der einzelnen Bindungsstellen, gibt n' nicht die Anzahl der Bindungsstellen wieder. In diesen Fällen wird aus n' der Hill-Koeffizient n_H , welcher rein qualitativ die Kooperativität der einzelnen Bindungsschritte angibt (vergl. Segel 1976). Die Hill-Gleichung gibt den Zusammenhang zwischen Substratkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit wieder:

$$\frac{k}{k_{max}} = \frac{[S]^{n'}}{K_{0,5}^{n'} + [S]^{n'}} \quad (4)$$

$k_{(max)}$: (maximale) Umsatzgeschwindigkeit
 $K_{0,5}$: Wert der halbmaximalen Aktivierung
 $[S]$: Substratkonzentration
 n' : Anzahl von Bindungsstellen

In ihrer Form:

$$\log \frac{k}{k_{max} - k} = n' \cdot \log [S] - \log (K_{0,5}^{n'}) \quad (5)$$

ergibt die Auftragung von $\log k/(k_{max} - k)$ gegen $\log [S]$ eine Gerade mit der Steigung n' und dem Ordinatenabschnitt $-\log (K_{0,5}^{n'})$. Aus den beiden Werten kann die Substratkonzentration bestimmt werden, bei der eine halbmaximale Enzymsättigung vorliegt.

2.6 Statistik

Bei einer ausreichenden Anzahl n von Meßwerten (Zellen) werden die Ergebnisse als Mittelwerte plus/minus Standardabweichung $\bar{x} \pm S(n)$ angegeben. Unterschiede wurden auf ihre Signifikanz durch den Student-Test überprüft. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit p von weniger als 5 Prozent ($p < 0,05$) wurden die Unterschiede als signifikant betrachtet.

III. Ergebnisse

3.1 Isolierung und Kultivierung von Purkinjezellen aus dem Warmblüterherzen

Verschiedene Arbeitsgruppen (Mehdi & Sachs 1978, Canale et al. 1983, Callewaert et al. 1984, Cohen et al. 1987) haben mit sehr unterschiedlichen Methoden Einzelzellen aus Purkinjefasern verschiedener Warmblüterherzen isoliert. Die morphologische Arbeit von Canale et al. (1983) gibt ebenso wie die Kurzmitteilung von Mehdi und Sachs (1978) keine Auskunft über die Ausbeute an intakten Zellen bei der jeweils verwendeten Präparationsmethode. Callewaert et al. (1984) beschreiben eine recht aufwendige Präparationsmethode mit einer geringen Ausbeute intakter Zellen ($\approx 3 \%$), welche für elektrophysiologische Experimente geeignet sind.

Im Abschnitt II. "Material und Methoden" der vorliegenden Arbeit wird eine Technik zur Isolierung von Einzelzellen aus Purkinjefasern beschrieben, die durchschnittlich 50 % intakte Purkinjezellen ergibt. Bei sehr guten Präparationen sind bis zu 90 % der Zellen intakt und für elektrophysiologische Experimente verwendbar. Die Zellen wurden bis zu 7 Wochen in Kultur gehalten. Mit der beschriebenen Methode konnten neben Purkinjezellen vom Schaf auch solche vom Kaninchen und vom Rind isoliert werden. Aufgrund der empirischen Ausarbeitung der Isolierungsmethode, kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob es sich bei den verwendeten Konzentrationen der Enzyme und dem zeitlichen Ablauf der Isolierung um notwendige Bedingungen für eine erfolgreiche Isolierung handelt.

Die einzelnen Schritte der Zellisolierung bauen folgendermaßen aufeinander auf:

Die anfänglich hohe Proteasekonzentration (Lösung B der Tabelle 2) führt zu einem Andauen und Weiten des bindegewebigen Schlauches um die Purkinjezellen (siehe Abb. 6A).

Die nominell Ca-freie extrazelluläre Lösung mit EGTA (Lösung C der Tabelle 2) bewirkt durch ihre geringe freie Ca-Konzentration eine elektrische Entkopplung der Herzzellen (vergl. Muir 1967).

Die Enzyme Collagenase und Elastase (Lösung D der Tabelle 2) führen zu einer Trennung der mechanischen Verbindungen der Purkinjezellen im Bereich der Glanzstreifen und zu einem Ablösen des Bindegewebes.

Die langsame Erhöhung der Ca-Konzentration (durch Zugabe von Lösung F) nach einer Periode in Lösungen mit geringer freier Ca-Konzentration ist notwendig, um eine irreversible Schädigung der Zellen durch das als Ca-Paradox bezeichnete Phänomen (Zimmermann & Hülsmann 1966) zu vermeiden.

Das Ausstreichen der Zellen aus ihrer bindegewebigen Hülle erfordert ein gewisses Maß an manueller Geschicklichkeit, um die Zellen nicht zu stark mechanisch zu beanspruchen.

Die beiden zuletzt genannten Schritte haben den größten Einfluß auf den Prozentsatz intakter Zellen. Die Rückführung der Ca-Konzentration auf ihren physiologischen Wert versetzt die Zellen in einen besonders empfindlichen Zustand (vergl. Altschuld et al. 1980, Haworth et al. 1980, Russo et al. 1981, Isenberg & Klöckner 1982a). Deshalb ist es notwendig die freie Ca-Konzentration in möglichst vielen kleinen Schritten sehr langsam (über insgesamt mindestens zwei Stunden) zu erhöhen. Außerdem sind unnötige mechanische Belastungen der Zellen während und direkt nach der Ca-Konzentrationserhöhung zu vermeiden.

Die frischisolierten Purkinjezellen (Abb. 6B) haben eine variantenreiche, wenig gestreckte Form mit deutlicher Querstreifung. Direkt nach der Isolierung zeigen die Zellen häufig spontane Kontraktionen, die jedoch innerhalb von 1 bis 2 Stunden aufhören. Die im Phasenkontrastmikroskop sichtbare Kontraktionsfrequenz liegt gewöhnlich bei 10-20 min^{-1} . Zellen mit Kontraktionsfrequenzen über 60 pro Minute sind meist irreversibel geschädigt und sterben nach kurzer Zeit ab. Die geschädigten Zellen zeigen erst Membranblasen

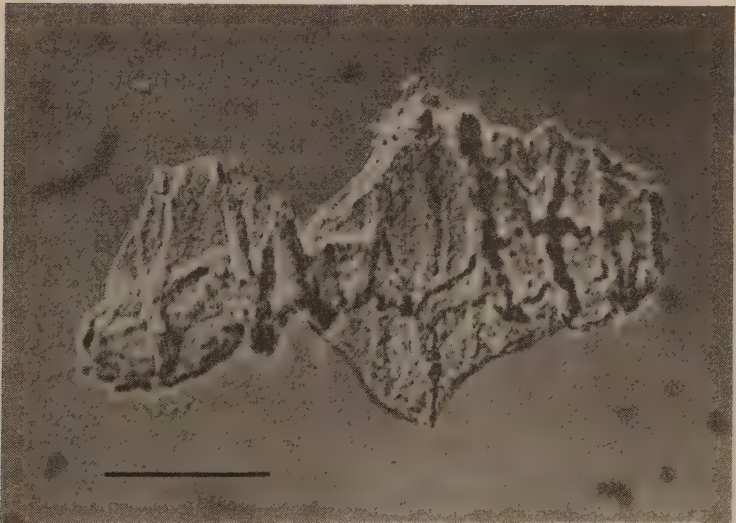
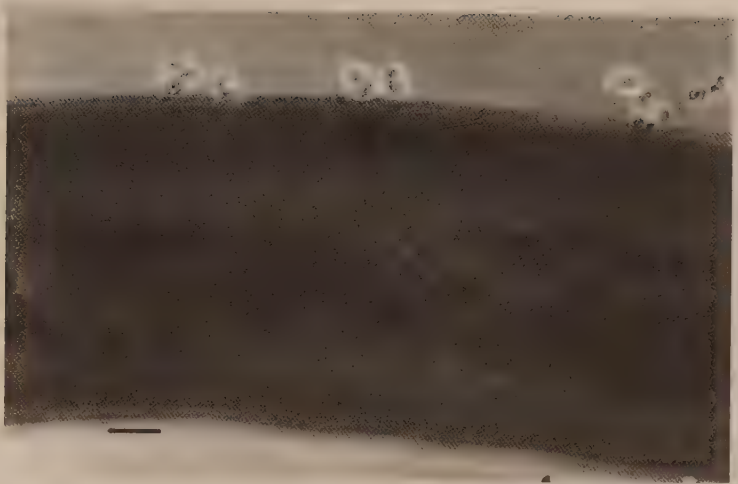


Abb.6 Purkinjezellen während und kurz nach der Isolierung.

- A. Angedauter Purkinjefaden aus dem Schafherzen,
Eichmarke: 100 μm .
- B. Spontanaktive Purkinjezellen während der Ca-Erhöhung,
Eichmarke: 50 μm .

(sogenannte blebs) und werfen schließlich die gesamte Zellmembran ab. Lichtmikroskopisch sind zu Beginn der Kultivierung auch intakte Erythrozyten in der Kultur zu erkennen, jedoch keine Fibroblasten aus dem Bindegewebe der Purkinjefäden.

Während der Kultivierung nehmen die Purkinjezellen nach 1-2 Tagen Kugelform an (Abb. 7A und 8A; Cardioballs, Bechem et al. 1983) und ihre Querstreifung geht verloren. Die Purkinjezellen von Schaf, Rind und Kaninchen unterscheiden sich lichtmikroskopisch nur in ihrer mittleren Größe (Durchmesser kugelförmiger Einzelzellen: Kaninchen 30-45 μm , Schaf 40-70 μm , Rind 50-90 μm). Beim Schaf kann beobachtet werden, daß mit zunehmendem Alter der Tiere der mittlere Durchmesser der Einzelzellen größer wird.

In 3-4 Tage alten Kulturen werden die ersten Fibroblasten lichtmikroskopisch sichtbar. Sie sind optisch weniger dicht und verglichen mit den Purkinjezellen sehr flach. Die Fibroblasten heften sich im Gegensatz zu den Cardioballs an den Schälchenboden und beginnen sich zu teilen. Die Purkinjezellen behalten ihre Kugelform für 7 bis 14 Tage. Erst am Ende dieses Zeitraumes kommt es, verbunden mit einer deutlichen Vermehrung der Fibroblasten, zu einem Anheften und Abflachen der Purkinjezellen.

Angeheftete Einzelzellen sind in der Lage sehr dünne cytoplasmatische Ausläufer zu bilden (Abb. 7B). Die freischwebenden Ausläufer haben keinen Kontakt zum Schälchenboden und sind immer auf eine andere intakte Einzelzelle gerichtet. Cytoplasmatische Fortsätze, die blind enden, oder Kontakt zu einer geschädigten Einzelzelle bilden, werden nicht beobachtet. Auf diese Weise entsteht nach mehr als 10 Tagen in Kultur erneut ein funktionelles Synzytium, welches wieder zur Erregungsleitung und damit zu synchronen Kontraktionen befähigt ist (vergl. Abb. 7B). In diesem Stadium tritt keine Spontanaktivität auf. Synchrone Kontraktionen der Zellen können jedoch durch mechanische Reizung einer einzelnen Zelle und durch die Gabe von Isoprenalin (ca. 10^{-6} M) hervorgerufen werden.

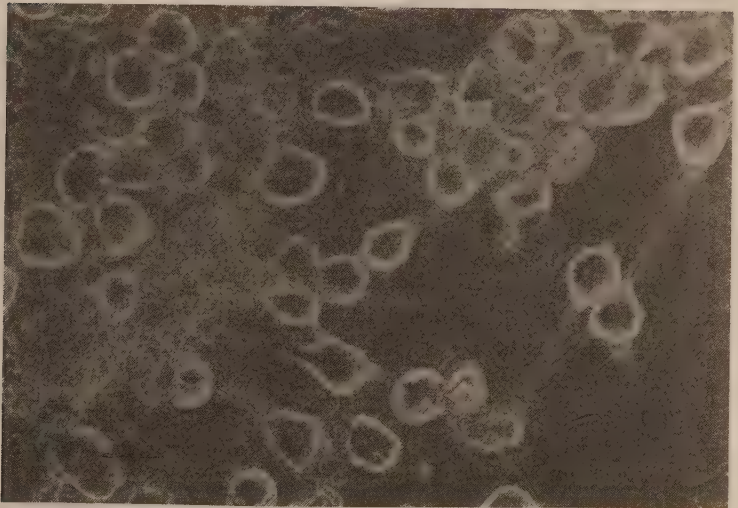
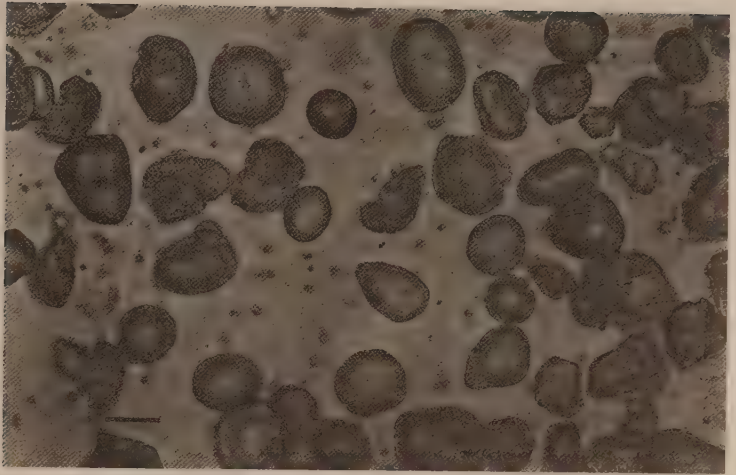


Abb.7 Kulturen isolierter Purkinjezellen.

- A. Purkinjezellen nach einem Tag in Kultur, Eichmarke: 50 μm .
- B. Purkinjezellen nach 17 Tagen in Kultur, Entwicklung eines funktionellen Synzytiums, Eichmarke: 50 μm .

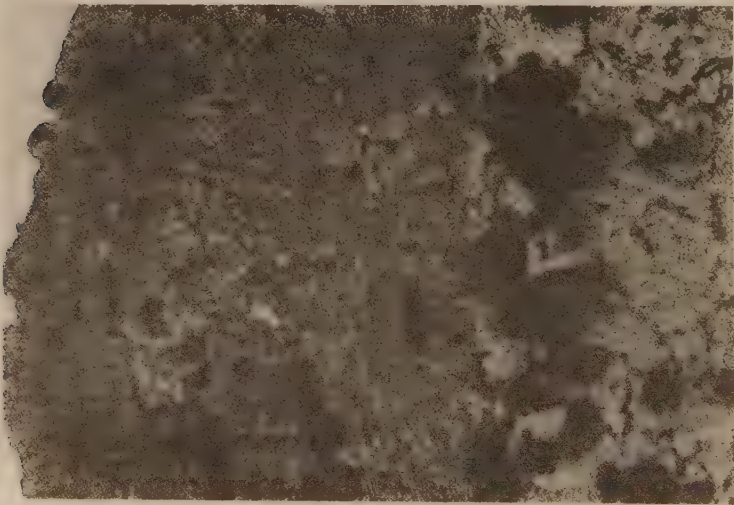
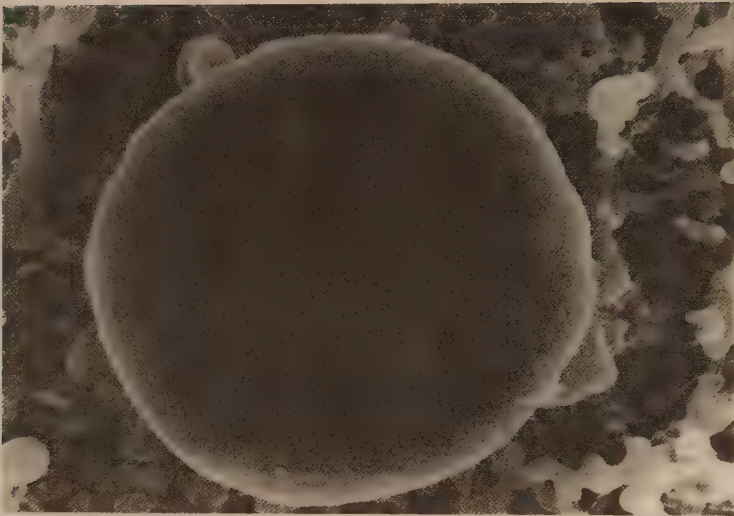


Abb.8 Elektronenmikroskopische Aufnahmen.

- A. Raster-elektronenmikroskopische Aufnahme einer isolierten Purkinjezelle nach einem Tag in Kultur, Eichmarke: 5 μm .
- B. Transmissions-elektronenmikroskopische Aufnahme eines Ultradünnschnittes einer Purkinjezelle nach 7 Tagen in Kultur, Eichmarke: 1 μm .

Bei einigen abgeflachten Zellen sind zwei Zellkerne mit jeweils einem Nucleolus erkennbar. Außerdem finden sich zeitweilig mitotische Teilungsfiguren. Eine Mitose von Purkinjezellen kann jedoch nicht beobachtet werden (vergl. Canale et al. 1983).

In elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Ultradünnschnitten isolierter und kultivierter Zellen (1-7 Tage in Kultur) ist eine Zonierung zu erkennen (vergl. Abb. 8B). Randständig befinden sich Filamente und Mitochondrien. In der ganzen Zelle befinden sich membranausgekleidete Hohlräume. Sehr oft sind ausgeprägte Sarkomerstrukturen angeschnitten. Ausschnittvergrößerungen zeigen eine deutliche Querstreifung (mit Z-Scheiben) der Muskulatur zu Beginn der Kultivierung. Die Mitochondrien (Christae-Typ) sind fast ausschließlich in der Nähe der Sarkomere zu finden. Die Zellmembran ist glatt und weist keine Einfaltungen auf.

In der zweiten Woche der Kultivierung kommt es zu deutlichen morphologischen Veränderungen. In Zellmembranschnitten sind viel häufiger als zu Beginn der Kultivierung Vesikel zu sehen. In der Nachbarschaft der Mitochondrien befinden sich Strukturen, welche einen Golgi-Apparat darstellen könnten. Dafür spricht auch die Beobachtung, daß in den Membranstapeln stark kontrastierende Punkte zu erkennen sind, wobei es sich um Ribosomen handeln könnte. Die Beobachtungen unterstützen die Vermutung einer verstärkten Syntheseleistung der Zelle.

Die kugelförmigen Purkinjezellen nach 1 bis 7 Tagen in Kultur eignen sich aus folgenden Gründen besonders für elektrophysiologische Experimente mit Hilfe der Patch-clamp-Technik.

Ihre kugelförmige Gestalt und ihr geringer Zelldurchmesser ermöglichen eine uniforme Spannungsklemme.

Veränderungen extrazellulärer Ionenkonzentrationen in unmittelbarer Nähe der Zellmembran (Anreicherungs- und Verarmungsphänomene) spielen vermutlich bei der glatten Oberfläche der Zelle eine geringe Rolle.

Für die interne Perfusion ist es von Vorteil, daß die Zellen nicht am Schälchenboden anhaften. Sie können so mit der Patch-clamp-Elektrode angehoben werden und sind damit unempfindlich gegenüber minimalen Bewegungen des Elektrodenhalters. Das intrazelluläre Milieu kann variiert und konstant gehalten werden.

Kultivierte Purkinjezellen haben ein stabiles Ruhepotential und zeigen im Normalfall keine Spontanaktivität. Ihr stabiles Cytoskelett macht sie weniger empfindlich gegenüber mechanischen Störungen (z.B. Lösungsdurchfluß), als dies bei isolierten Vorhofzellen des Meerschweinchens der Fall ist.

3.2 Elektrophysiologische Eigenschaften der kultivierten Purkinjezellen

Purkinjefasern werden seit vielen Jahren für elektrophysiologische Experimente verwendet. Neben einer Reihe von Ionenströmen und deren Regulation ist an diesem Präparat die Na/K-Pumpe besonders intensiv untersucht worden. In den letzten Jahren haben sich aber auch die Grenzen der Verwendung von Purkinjefasern gezeigt. Die extrazellulären Spalträume des Purkinjefadens bereiten Schwierigkeiten in elektrophysiologischen Untersuchungen. In der Spannungs-klemme kann es zu Änderungen der Kaliumkonzentration in den Spalträumen kommen. Außerdem stellen die Spalträume und verbindende Strukturen zwischen den Zellen (sogenannte intercalated discs, Page et al. 1969) Diffusionsbarrieren dar.

Nachdem viele Untersuchungen mittels Variation des extrazellulären Mediums durchgeführt worden sind, ist es zunehmend interessanter, auch das intrazelluläre Medium zu variieren. Dies ist jedoch an einem multizellulären Präparat nur bedingt möglich und dann auch nur indirekt über eine Änderung des extrazellulären Mediums. Häufig ist es nur schwer möglich nach Veränderung der ionalen Zusammensetzung der Badlösung einen neuen steady-state auf einem bestimmten Niveau zu erreichen. An diesem Punkt schafft die Verwendung von Einzelzellen Abhilfe.

Für die Einzelzelle muß gezeigt werden, daß sie sich nach der Isolierung und Kultivierung nicht in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften vom multizellulären Präparat unterscheidet. Für Vorhofzellen vom Meerschweinchen (Bechem et al. 1983), Ventrikelzellen verschiedener Spezies (Isenberg & Klöckner 1982a, b, c) und Atrioventricular- sowie Sinusknotenzellen vom Kaninchen (Taniguchi et al. 1981) konnte dies bereits nachgewiesen werden.

Ein erster Vergleich der elektrophysiologischen Eigenschaften der Purkinjezellen mit den bekannten Eigenschaften der Purkinjefasern ist möglich, direkt nachdem die Einzelzelle durchgesaugt worden ist. In Abhängigkeit von dem geklemmten Membranpotential lassen sich durch depolarisierende Pulse der schnelle Na-Einstrom (I_{Na}) (Dudel & Rüdel 1970) und der durch Cadmium blockierbare Ca-Einstrom (Reuter 1967) auslösen. Durch hyperpolarisierende Pulse wird der Cs-blockierbare Schrittmacherstrom (Vassalle 1970) ausgelöst bzw. vergrößert. Diese drei spannungsabhängigen Ströme stimmten in Kontrollexperimenten mit den gleichen Strömen in multizellulären Präparaten überein.

Die Form der steady-state-Strom-Spannungs-Beziehung einer Einzelzelle setzt sich aus einer Vielzahl passiver und aktiver Membranstromkomponenten zusammen. Aus einer I-V-Beziehung läßt sich für weitere Vergleiche der spezifische Membranwiderstand bestimmen (siehe Krahn 1986). Bedingt durch die Abhängigkeit der Strom-Spannungs-Beziehung von vielen Faktoren, ergibt sich eine große Variabilität ihrer Form. Zum Vergleich werden in Abb. 9 die Strom-Spannungs-Beziehungen einer Purkinjefaser (aus Krahn 1986, Abb. 9) und einer Purkinjeeinzelzelle zusammen dargestellt. Die externen Lösungen sind in beiden Experimenten bis auf die verwendete Puffersubstanz identisch. Die Purkinjefaser wurde mit einer Carbonat-gepufferten Lösung umspült. Die Carbonat-gepufferte Lösung hatte eine um 5 mM höhere Na-

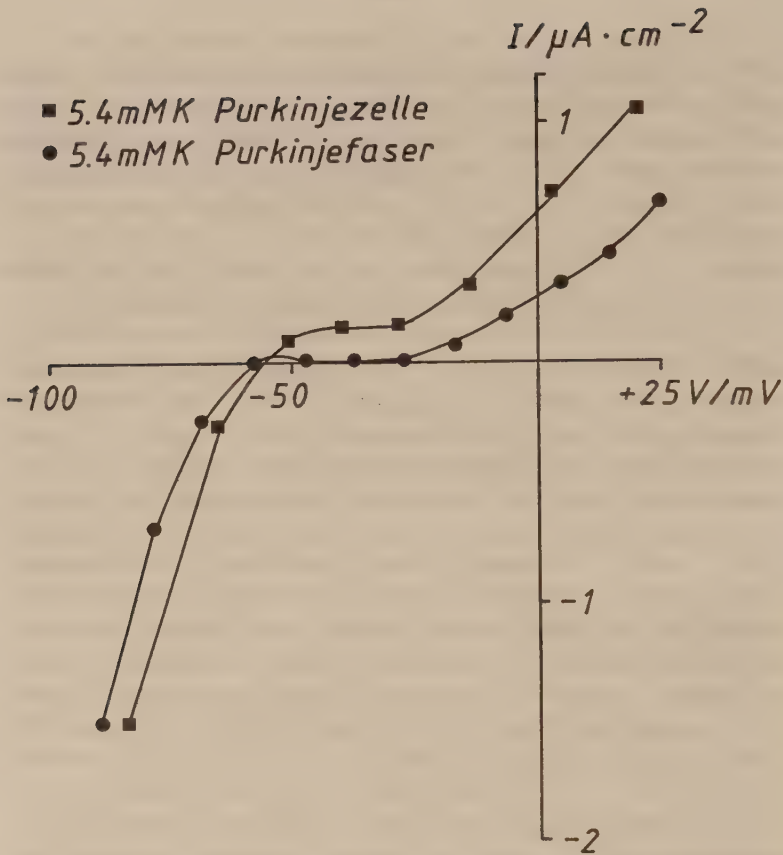


Abb.9 Steady-state-Strom(I)-Spannungs(V)-Beziehung einer Purkinjefaser und einer Purkinjezelle des Schafherzens in 5,4 mM K-Tyrodellösung.

Die I-V-Beziehung der Purkinjefaser (●) stammt aus der Arbeit von Krahn (1986, Abb. 9). Um den Vergleich mit der I-V-Beziehung der Einzelzelle (■) zu erleichtern, wurde die Stromdichte in $\mu A \cdot cm^{-2}$ gegen das Membranpotential in mV aufgetragen. Die I-V-Beziehung der Purkinjefaser (●) wurde registriert, indem das Haltepotential stufenweise für je 5 Sekunden von ca. -40 mV aus zunächst in hyper- und dann in depolarisierende Richtung variiert wurde. Bei der Einzelzelle erfolgten von -40 mV aus einzelne Spannungspulse von 800 ms Dauer auf das entsprechende Haltepotential (vergl. Abb. 24). T: (■) 33°C, (●) 34°C.

Konzentration. Schwierigkeiten bereitete die Zusammensetzung der internen Lösung bezüglich der physiologischen Ca-Pufferung. Das Problem der intrazellulären Ca-Pufferung wurde dadurch umgangen, daß direkt nach dem Durchsaugen der Zellmembran die Strom-Spannungs-Beziehung der Einzelzelle aufgenommen wurde. Zu diesem Zeitpunkt ist das Cytoplasma der Zelle erst wenig gegen die interne Pipettenlösung ausgetauscht.

In den untersuchten passiven und aktiven Membranstromkomponenten war bislang kein prinzipieller Unterschied zwischen Purkinjefasern und Einzelzellen feststellbar.

3.3 Nachweis des elektrogenen Na-Transportes

Der elektrogene Na-Transport kann durch die Anwendung des spezifischen Hemmstoffes Dihydro-g-strophanthin (DHO) blockiert und damit nachgewiesen werden. DHO gehört zur Gruppe der Herzglykoside und hat den Vorteil einer schnellen Wirksamkeit (große Geschwindigkeitskonstante der Herzglykosidbindung) (Daut & Rüdel 1982) und einer relativ schnellen Abdissoziation. Deshalb läßt sich DHO gut wieder auswaschen und die hemmende Wirkung ist reversibel.

In Abb. 10 ist die Identifizierung des Na-Pumpenstromes durch DHO dargestellt. Die obere Spur zeigt den Membranstrom und die mittlere Spur die Membranspannung einer Purkinjezelle (1 Tag in Kultur) in der Ganzzelleableitung. Die Zeitregistrierung (untere Spur) beginnt mit dem Durchsaugen der Zellmembran. Zum Zeitpunkt ($t = 0$), an dem der Austausch des Cytoplasmas gegen die Pipettenlösung beginnt, konnte der schnelle Na-Einstrom beobachtet werden. Die Dauer des Austausches bis zu einem steady-state ist abhängig von dem Öffnungsdurchmesser der Patch-clamp-Pipette (Widerstandskontrolle) und der Größe der Einzelzelle. Die Registrierung in Abb. 10 stammt von einer relativ großen Einzelzelle (Durchmesser: 71 μm). Deshalb ist die Zeit bis zur Einstellung eines neuen

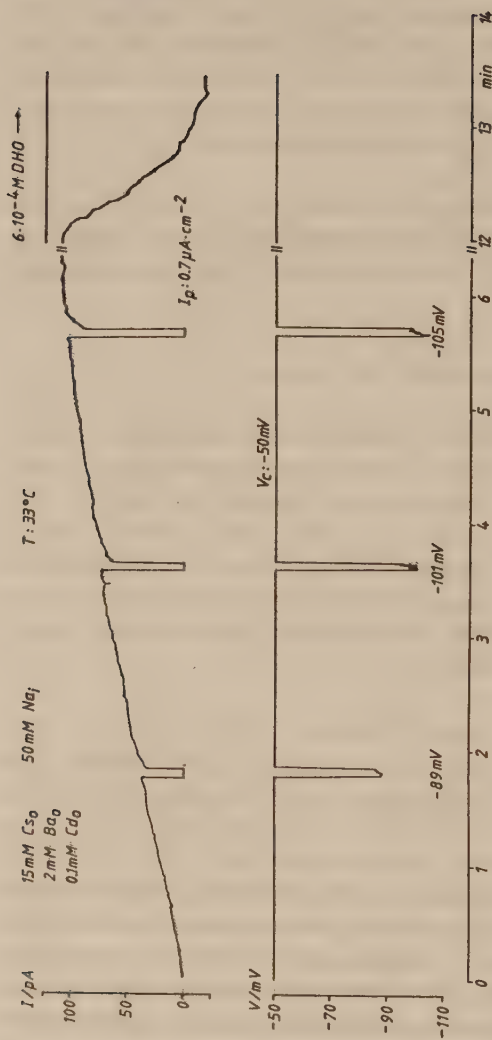


Abb. 10 Ganzzellaufleitung (whole cell recording, WCR) von einer isolierten und kultivierten Purkinjezelle aus dem Schaffherzen.

Der Cardioball zeigt einen DHO-hemmbar Auswärtsstrom. Parallel zur Haltestromverschiebung findet sich nach Ausschalten der Spannungsquelle eine zunehmende Hyperpolarisation der Zellmembran.

Obere Spur : Haltestrom

Mittlere Spur : geklemmtes (V_c) und freilaufendes Membranpotential

Untere Spur : Zeitachse

stationären Zustandes (6-7 min) entsprechend lang. In der Stromregistrierung ist in den folgenden 6 Minuten keine weitere Verschiebung sichtbar. Während des Austausches des Cytoplasmas wird ein zunehmender Auswärtsstrom registriert. Parallel dazu kann eine Hyperpolarisation der Zellmembran (mittlere Spur) aufgezeichnet werden, wenn die Spannungsklemme kurzzeitig ausgeschaltet wird. Der Auswärtsstrom hyperpolarisiert die Zelle auf -105 mV. Die Anwendung von DHO führt zu einem Verschwinden des Auswärtsstromes und der Haltestrom ist bei einem Klemmpotential von -50 mV einwärtsgerichtet. Geht man davon aus, daß die verwendete DHO-Konzentration den elektrogenen Na-Transport vollständig gehemmt hat, so beträgt der Pumpenstrom 135 pA bzw. $0,7 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ bei 50 mM c^i_{Na} und 15 mM c^o_{Cs} . Experimente an Purkinjefasern haben gezeigt, daß bis zu einer c^o_{K} von 16 mM 10^{-4} M DHO ausreicht, eine maximale Hemmung der Na/K-Pumpe zu erzielen (Krahn 1986). Weil es beim Anblasen der Zellen eventuell zu einer Durchmischung der Anblaslösung mit der Badlösung kommt und dadurch zu einer Verringerung der DHO-Konzentration, wurden höhere DHO-Konzentrationen ($> 10^{-4}$ M) in der Anblaspipette verwendet.

3.4 Abhängigkeit des Na/K-Pumpenstromes

3.4.1 - von der intrazellulären Na-Konzentration

Einen Beweis dafür, daß der verstärkte Auswärtsstrom durch Erhöhung von c^i_{Na} hervorgerufen werden kann, liefert Abb. 11. In dem gezeigten Experiment wird die interne Lösung mehrfach ausgetauscht. Der erste Austausch des Cytoplasmas erfolgt gegen eine interne Lösung mit einer Na-Konzentration von 10 mM. Nachdem sich im Membranstrom (obere Spur) ein steady-state eingestellt hat, wird die interne Lösung durch eine neue Lösung mit einer Na-Konzentration von 50 mM ersetzt. Bevor die neue Lösung angesaugt werden kann, muß die kleine Arterienklemme entfernt werden, welche den Schlauch zur internen Füllpipette abquetscht. Das Eingreifen in den abgeschirmten Versuchsstand führt häufig zu elektrischen Störungen für

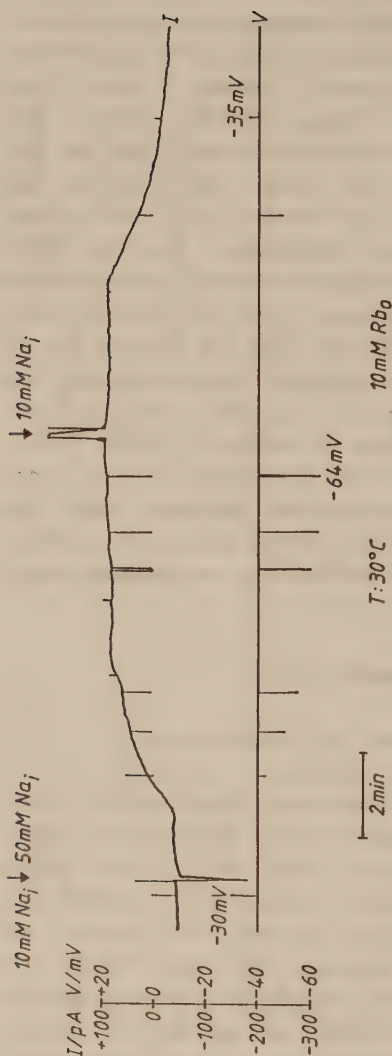


Abb. 11 Ganzzellaableitung von einer Purkinjezelle aus dem Schafherzen.

Die Zelle wird mit 2 verschiedenen internen Lösungen perfundiert. Als extrazelluläres Aktivatorion der Na/K-Pumpe wird Rb^+ (10 mM) verwendet. Die obere Spur zeigt den Haltestrom in der Spannungsklemme. Die untere Spur gibt das Membranpotential wieder. Das Haltepotential (V_c) beträgt -40 mV. Das freilaufende Membranpotential wird jeweils kurzfristig registriert, indem die Spannungsklemme ausgeschaltet wird ($I = 0$ pA). Die Erhöhung der intrazellulären Na-Konzentration führt zu einer reversiblen Haltestromverschiebung und Hyperpolarisation der Zellmembran.

die Dauer des Eingriffes (siehe Abb. 11, Pfeilmarkierungen). Da das System für die interne Perfusion sehr vorsichtig mit neuer Lösung durchspült werden sollte, kann es bis zu zwei Minuten dauern, bevor die Lösungswege ausreichend mit neuer Lösung durchspült sind. Sobald die neue Lösung in der Patch-clamp-Pipettenspitze angelangt ist, beginnt der Austausch mit dem Zellinneren. Die Erhöhung von c'_{Na} führt zu einer Verschiebung des Haltestromes in Auswärtsrichtung oder zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran (untere Spur), wenn die Spannungsklemme ausgeschaltet wird. Bis zum Erreichen eines neuen Gleichgewichtes verschiebt sich der Haltestrom um 150 pA. Der zusätzlich generierte Auswärtsstrom führt zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran von -30 auf -64 mV. Beide Effekte sind nach dem erneuten Ansaugen der ursprünglichen internen Lösung (2. Pfeilmarkierung, c'_{Na} 10 mM) voll reversibel.

Die Auswirkungen verschiedener intrazellulärer Na-Konzentrationen auf den Pumpenstrom sind in Abb. 12 dargestellt. Es werden wieder die beiden internen Lösungen mit 10 und 50 mM Natrium verwendet. Nachdem jeweils ein steady-state erreicht ist, wird der DHO-sensitive Strom gemessen. Mit dem Auswaschen des Pharmakons entwickelt sich erneut ein Auswärtsstrom. Der neue steady-state-Wert ist im Vergleich zum Wert vor DHO-Gabe um -15 pA in Einwärtsrichtung verschoben (c'_{Na} 10 mM). Die Erhöhung der intrazellulären Na-Konzentration führt zu einer weiteren Verschiebung des gesamten Membranstromes um 90 pA in Auswärtsrichtung. Das erneute Anblasen der Zelle mit einer $8 \cdot 10^{-4}$ M DHO-haltigen Lösung verschiebt den Haltestrom um -145 pA auf den gleichen Wert wie die DHO-Gabe bei 10 mM c'_{Na} . Die Übereinstimmung der beiden Halteströme unter DHO, deutet darauf hin, daß das verwendete Herzglykosid keine anderen Wirkungen als eine Hemmung der Na/K-Pumpe hat.

In gleicher Weise wurden Versuchsreihen durchgeführt, in denen der Pumpenstrom bei 10 mM c'_{Na} jeweils mit dem Pumpenstrom bei c'_{Na} 5 oder 30 mM verglichen wurde. Das Haltepotential betrug in allen Versuchen ca. -40 mV.

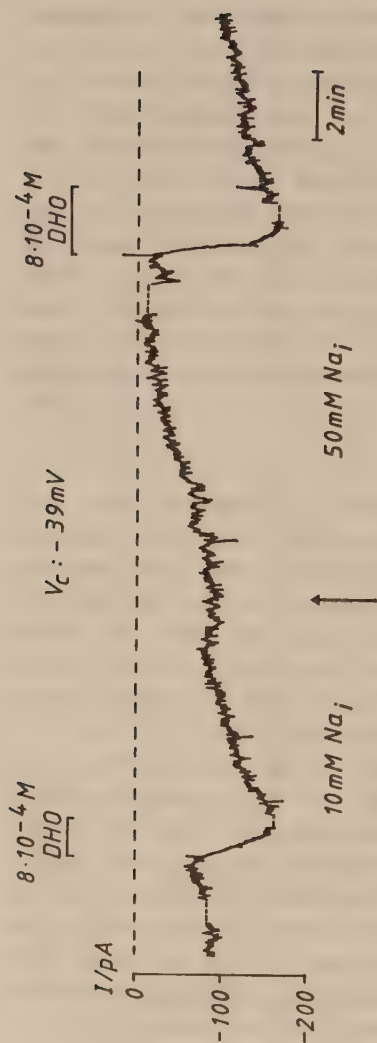


Abb.12 Abhängigkeit des DHO-hemmbareren Stromes (I_p) von der intrazellulären Na-Konzentration, WCR von einer intrazellulär perfundierten Einzelzelle.

Der Pumpenstrom wird bei 10 und 50 mM Na_i bestimmt. Der interne Lösungswechsel beginnt zu dem durch den Pfeil markierten Zeitpunkt. In den gestrichelten Zeiträumen wurden bei einer schnelleren Schreibergeschwindigkeit Strom-Spannungs-Beziehungen registriert. Zu beachten ist das gleiche Stromniveau unter beiden DHO-Anwendungen sowie der zusätzliche Auswärtsstrom bei Erhöhung von c_{Na}^i . T: 32°C.

An drei Einzelzellen wurde der DHO-hemmbarer Strom bei interner Perfusion der Zellen mit einer Na-freien Lösung gemessen (Abb. 13). In diesem und in den anderen Experimenten ist kein eindeutig DHO-hemmbarer Strom bei $c'_{Na} = 0$ mM feststellbar. In Abb. 13B ist zudem gezeigt, daß sich durch interne Perfusion mit einer 30 mM Na-haltigen Lösung der Haltestrom um ca. 80 pA in Auswärtsrichtung verschiebt. Der Betrag der Haltestromverschiebung entspricht annähernd dem DHO-sensitiven Strom. Die Pumpenstromdichte in $c'_{Na} = 0$ mM ergibt $0,04 \pm 0,05 \mu A \cdot cm^{-2}$ ($n = 3$). Da dieser Wert statistisch gesehen nicht von Null verschieden ist, wird die Kurve in Abb. 14 bis zum Nullpunkt verlängert.

In Abb. 14 sind die gemessenen Pumpenstromdichten in Abhängigkeit von c'_{Na} aufgetragen. Die I_P -Dichten bei einer Na_i -Konzentration von 5, 30 oder 50 mM sind normiert auf die Pumpenstromdichte bei $c'_{Na} = 10$ mM. Die mittlere Pumpenstromdichte bei $c'_{Na} = 10$ mM betrug $0,54 \pm 0,34 \mu A \cdot cm^{-2}$ ($n = 26$). Die Meßwerte deuten darauf hin, daß der Pumpenstrom als Funktion von c'_{Na} mit zunehmender c'_{Na} einem Maximalwert zustrebt. Der Maximalwert $I_{P \max}$ (gestrichelte Linie) wird aufgrund der Verteilung der Meßwerte bei einer relativen Pumpenstromdichte von 2 (ca. $1 \mu A \cdot cm^{-2}$, vergl. Chapman 1984) angenommen.

Die gemessenen Pumpenstromdichten werden unter Verwendung der geschätzten maximalen Pumpenstromdichte in einem Hill-Diagramm aufgetragen (Abb. 15). Aus der Hill-Auftragung ergibt sich ein Hill-Koeffizient von 1,53 und eine halbmaximale Pumpenstromdichte bei einer c'_{Na} von ca. 9 mM. Setzt man diese Werte in die Gleichung der Abb. 14 ein, so erhält man die dort gezeigte Kurve.

3.4.2. - von der intra- und extrazellulären Mg-Konzentration

Seit den Arbeiten von Skou (1957, 1960), sowie Dunham und Glynn (1961) ist bekannt, daß die Aktivität der Na/K-Pumpe

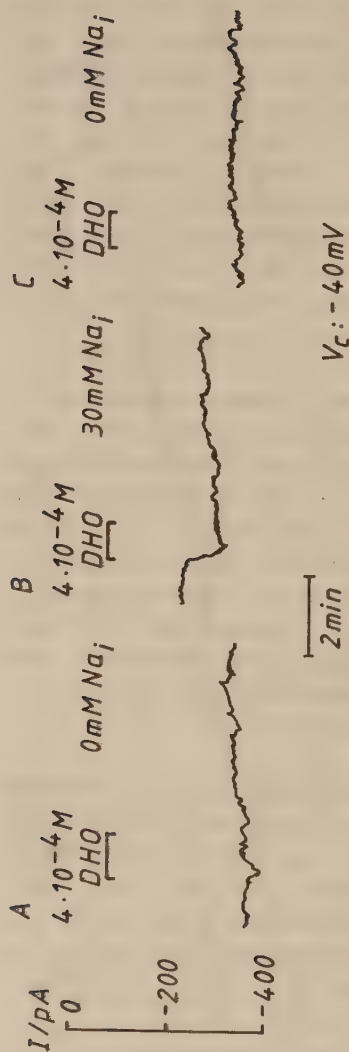


Abb.13 Der Pumpenstrom einer isolierten Purkinjezelle aus dem Schafherzen in Na-freier interner Lösung.

I_p wird durch 0 mM c^i_{Na} reversibel gehemmt. Das Einwaschen von 30 mM c^i_{Na} führt zu einer DHO-hemmbareren Haltestromverschiebung in Auswärtsrichtung. Das Zeitintervall zwischen A und B beträgt 8 Minuten und zwischen B und C 12 Minuten. T: 33°C .

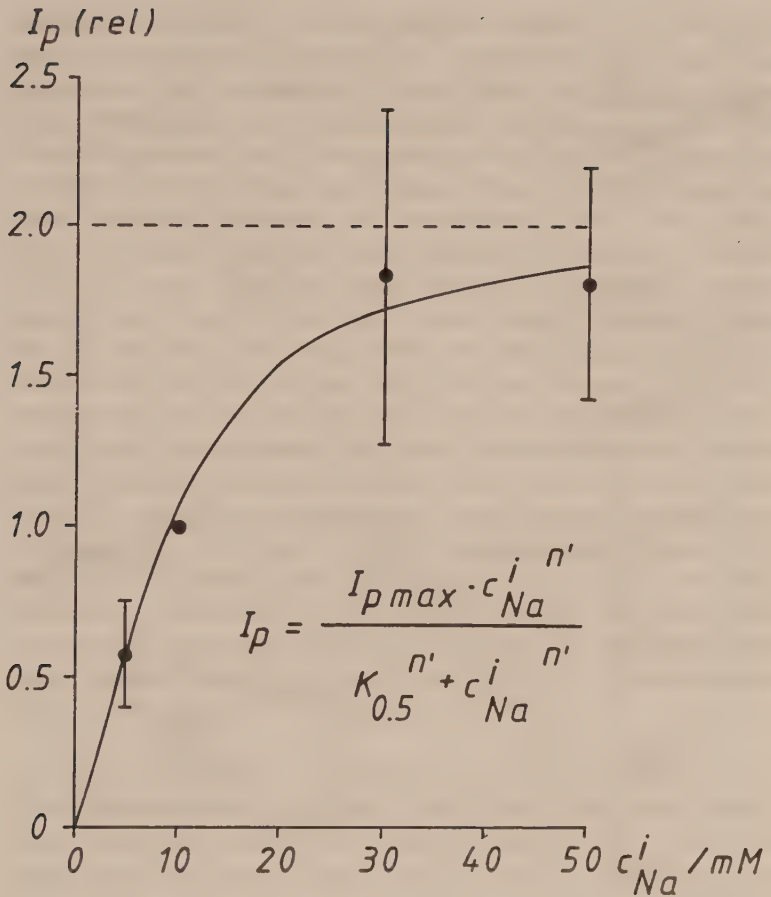


Abb.14 Relative Pumpenstromamplitude von isolierten Purkinjezellen aus dem Schafherzen als Funktion von c^i_{Na} .

Die I_P -Werte bei 5, 30 und 50 mM $NaCl$ sind relativ zur I_P -Amplitude bei 10 mM c^i_{Na} gegen die Na -Konzentration in mM aufgetragen. Das Haltepotential beträgt -40 mV. Den gezeigten Mittelwerten mit Standardabweichung liegen 7 bis 25 Messungen zugrunde. Die gestrichelte Linie deutet den geschätzten maximalen Pumpenstrom ($I_{P \max}$) an. Der eingezeichnete Kurvenverlauf stellt die Abhängigkeit dar, die sich aus der angegebenen Gleichung ergibt. T: 30-33 °C.

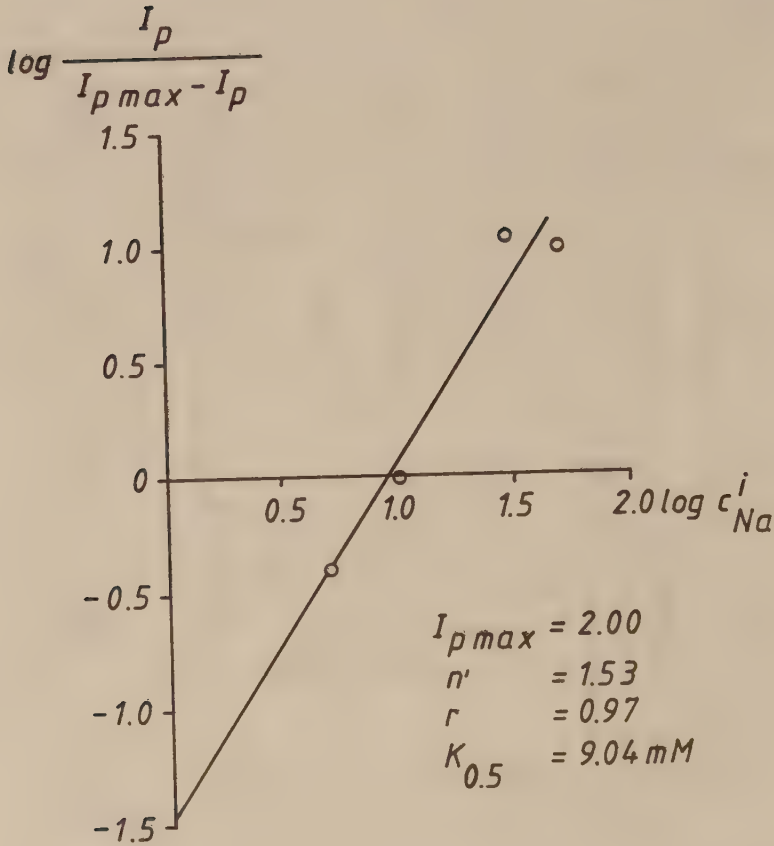


Abb.15 Hill-Diagramm der Meßwerte aus Abb. 14 zur Bestimmung der Hill-Koeffizienten und der halbmaximal aktivierenden Na^+ -Innenkonzentration ($K_{0.5}$).

Der Korrelationskoeffizient (r) der berechneten Geraden beträgt 0,97. c'_{Na} ist auf 1 mM Na bezogen und daher dimensionslos.

Magnesium erfordert. Da die Mg-Bindungsstelle, welche den aktiven Transport kontrolliert, wahrscheinlich auf der Innenseite der Zellmembran liegt, wird auch an Herzzellen eine Abhängigkeit des Pumpenstromes von c'_{Mg} vermutet. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde mittels interner Perfusion die c'_{Mg} gesenkt. Nach einer Kontrollmessung in einer internen Lösung mit einem Mg-Gehalt von 11 mM wurden die Zellen mit einer internen Lösung perfundiert, welche 1,2; 0,5 oder 0 mM Mg enthielt. An insgesamt 8 Zellen konnte auf diese Weise weder eine Haltestromverschiebung ($V_c = -40$ mV) noch eine Änderung der Pumpenstromdichte registriert werden. Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß die intrazelluläre Mg-Konzentration nicht ausreichend gesenkt wurde. Eine Möglichkeit, die freie Mg-Konzentration in der Zelle schneller und stärker zu senken, besteht darin, einen Komplexbildner zu verwenden mit einer höheren Spezifität gegenüber Mg, als dies beim EGTA der internen Lösungen der Fall ist. Deshalb wurden im folgenden 2 mM der 6 mM EGTA durch EDTA oder CDTA ersetzt. Dabei ist zu beachten, daß CDTA ein spezifischer Komplexbildner für Mg ist. Magnesium wird stärker an CDTA gebunden, als das konkurrierende zweiwertige Kation Ca (Wallick et al. 1973).

Um eine Beeinflussung der intrazellulären Mg-Konzentration durch die extrazelluläre Mg-Konzentration auszuschließen, wurde neben der intern Mg-freien Perfusion auch noch eine externe Perfusion mit Mg-freier Lösung vorgenommen. Die Wirkung Mg-freier extrazellulärer Lösung auf den Pumpenstrom ist exemplarisch in Abb. 16 dargestellt. Die extrazelluläre Mg-freie Lösung (B) beeinflusst den Pumpenstrom nicht (vergl. B mit A und C). Aber auch die extra- und intrazelluläre Anwendung von Mg-freien Lösungen (D) führt nicht zu einer deutlichen Änderung des DHO-sensitiven Stromes (vergl. D mit A - C). Die DHO-Applikation in Abb. 16D erfolgte nach 9 Minuten Perfusion mit intra- und extrazellulären Lösungen ohne Mg. Die Pumpenstromdichte der Einzelzelle ist zu diesem Zeitpunkt (D, nach 73 Minuten) ebenso groß wie in A-C. Lediglich der Haltestrom hat sich durch die Änderung anderer Membranstromkomponenten in Einwärtsrichtung verschoben.

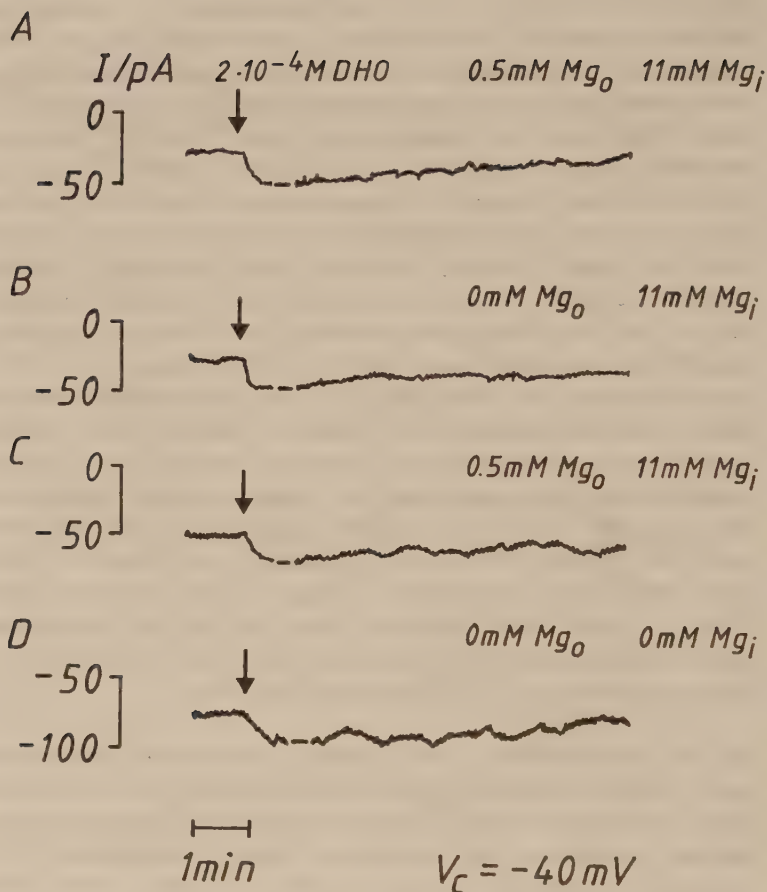


Abb.16 Originalregistrierungen des Pumpenstromes in Abhängigkeit von Mg_o und Mg_i .

Mittels externer und interner Perfusion wird c^o_{Mg} und c^i_{Mg} variiert bei konstanter Konzentration der Aktivator-kationen $Cs_o = 10 \text{ mM}$ und $Na_i = 30 \text{ mM}$. Alle Registrierungen stammen von derselben isolierten Purkinjezelle. Die Hemmung von I_p erfolgt durch Anblasen der Zelle mit $2 \cdot 10^{-4}$ DHO (durch Pfeile markiert) in A: 19 min, B: 37 min, C: 54 min und D: 73 min nach dem Beginn der Ganzzellableitung. Die Pumpenstromdichte beträgt in A-D je $0,36 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$. T: $30,4^\circ\text{C}$.

Anhand des gezeigten und 3 weiterer, vergleichbarer Experimente kann keine Änderung der Pumpenstromdichte bei Herabsetzung von c'_{Mg} oder c''_{Mg} festgestellt werden. In den bisher beschriebenen Experimenten konnte I_p durch die Gabe von DHO nur in einem Abstand von ca. 15 Minuten bestimmt werden, da das Auswaschen des Herzglykosides langsam erfolgt. Bei Einzelzellen mit einer günstigen geometrischen Form kann die Na/K-Pumpe auch durch den Entzug extrazellulärer Aktivatorationen gehemmt werden (vergl. Abb. 27). Die Cardioballs wurden daher in den weiteren Versuchen von einer extrazellulären Lösung umspült, die keine extrazellulären Aktivatorationen der Na/K-Pumpe enthält. Es entwickelt sich aber innerhalb weniger Sekunden ein Auswärtsstrom, wenn die Cardioballs mit einer Cs- oder K-haltigen externen Lösung angeblasen werden.

In Abb. 17 ist zu sehen, daß mit der Beendigung des Anblasens die Verschiebung des Haltestromes ebenso schnell reversibel ist. Durch das Anblasen der Zellen für ca. 20 Sekunden in Abständen von ca. 2 Minuten kann man die zeitliche Veränderung der Pumpenstromamplitude gut beurteilen. Abb. 17 zeigt in der oberen Spur die Änderung der c''_{Cs} durch das Anblasen der Zelle. Unter der originalen Stromspur ist jeweils die Änderung der c''_{Cs} in der Badlösung angegeben. Das Anblasen einer hohen Konzentration des extrazellulären Aktivatorations Cs (20 mM) ergibt eine Haltestromverschiebung. Der Betrag der Haltestromverschiebung ist unabhängig davon, ob die Lösung angeblasen oder über die Badperfusion appliziert wird. In einer Badlösung mit Aktivatorationen, in der zusätzlich mit derselben Lösung angeblasen wird, ist keine Haltestromverschiebung festzustellen, wenn der Austausch der Badlösung erfolgt ist. Ein vollständiger Austausch der Versuchskammer dauert unter den gegebenen Bedingungen mehrere Minuten. Die fehlende Haltestromverschiebung in Lösungen mit Aktivatoration und DHO zeigt, daß es bei dem angegebenen Haltepotential durch das Anblasen nicht zu Leitfähigkeitsänderungen oder unspezifischen Anblaseeffekten kommt. Die Verschiebung des Haltestromes beim Anblasen von Lösungen mit Aktivatorationen wird als Pumpenstrom-

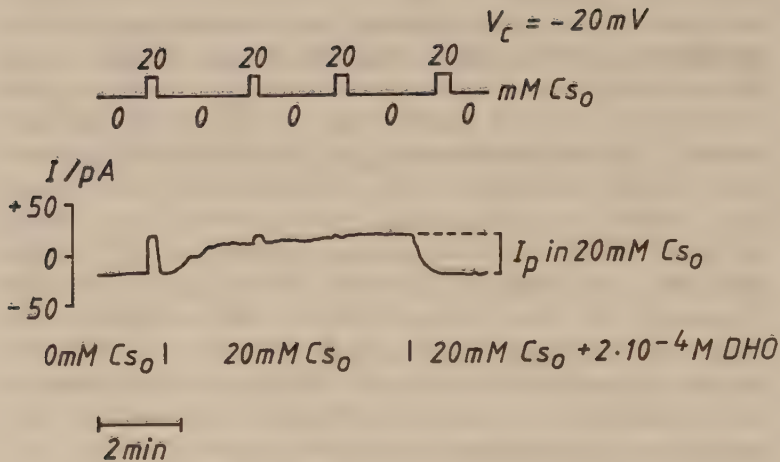


Abb.17 Vergleich der Amplituden des DHO-hemmabaren Stromes einer isolierten Purkinjezelle aus dem Schafherzen in der Ganzzellableitung.

Die obere Spur zeigt die Änderung von $c^{\circ}\text{Cs}$ an der Zellmembran durch das Anblasen einer Cs-haltigen externen Lösung. Die Veränderung der Cs-Konzentration in der Badlösung und die Gabe von DHO ist in der unteren Schriftzeile markiert. Die untere Spur zeigt den Haltestrom. Das Haltepotential beträgt -20 mV . T: $31,4^{\circ}\text{C}$.

amplitude angesehen, weil der Betrag der Haltestromverschiebung in Auswärtsrichtung mit dem Betrag der Einwärtsverschiebung unter DHO übereinstimmt (vergl. Abb. 17). Außerdem ist unter DHO während des Anblasens mit Aktivator-kationen keine Änderung des Haltestromes feststellbar.

In Abb. 18 ist nach ca. 6 Minuten durch die Erhöhung von c'_{Na} auf 30 mM ein maximaler Pumpenstrom erreicht, der im folgenden langsam abnimmt. Nach 22 Minuten wird die interne Lösung ohne Mg und mit CDTA gegen eine Lösung mit 11 mM Mg ausgetauscht. Daraufhin wird die Abnahme der Pumpenstromamplitude gestoppt. Es ist sogar eine Zunahme der Amplitude von I_p festzustellen, wobei der maximale Wert jedoch nicht wieder erreicht wird. Der Wechsel der externen Lösung auf die gleiche Lösung, mit der zuvor angeblasen wurde, zeigt, daß die Stromverschiebungen unter beiden Bedingungen nahezu identisch sind. Die nach 33 Minuten einsetzende Haltestromverschiebung schwächt etwas die Aussagekraft der folgenden Registrierung. Es kommt jedoch weder in der Cs-haltigen externen Lösung noch unter der zusätzlichen Gabe von $2 \cdot 10^{-4}$ M DHO zu einer durch das Anblasen mit Cs bedingten Haltestromverschiebung (vergl. Abb. 17). Abb. 18 zeigt allerdings die einzige Registrierung in der durch die Erhöhung der intrazellulären Mg-Konzentration eine Erhöhung der Pumpenstromamplitude stattfand. In sechs weiteren Experimenten konnte nach der Erhöhung von c'_{Mg} keine vergrößerte Pumpenstromamplitude registriert werden. Es hatte jedoch den Anschein, daß die Abnahme des Pumpenstromes mit zunehmender Versuchsdauer (run-down) durch die interne Perfusion mit Mg-haltiger Lösung verlangsamt wurde.

Zur Überprüfung der Hypothese, daß es ohne intrazelluläres Magnesium zu einer verstärkten Abnahme der I_p -Amplitude (run-down) kommt, wurden die Zeiten bestimmt, innerhalb derer der initiale Pumpenstrom auf die Hälfte abgefallen war. Bei der intra- und extrazellulären Anwendung von Mg-freien Lösungen betrug diese Zeit $29 \text{ min} \pm 10$ ($n = 3$). Enthielten beide Lösungen Magnesium, so wurde eine Zeit von

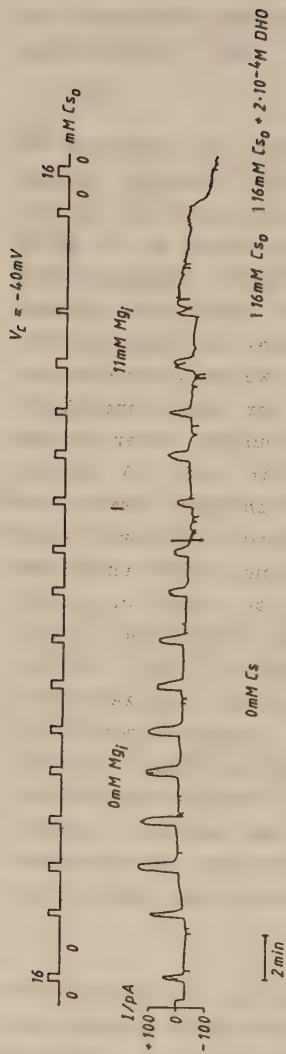


Abb.18 Pumpenstromamplitude in Abhängigkeit von Cs^+_{Mg}

Die obere Spur zeigt die Änderung der Cs -Konzentration an der Außenseite der Zellmembran. In externer Lösung ohne extrazelluläres Aktivator-kation der Na/K -Pumpe wird in den markierten Zeiträumen mit Cs -haltiger externer Lösung angeblasen. Die untere Spur zeigt den Haltestrom eines Cardioballs. Das Anblasen mit Caesium führt zu einer Verschiebung des Haltestromes in Auswärtsrichtung ($I_{p \text{ max}} = 120 \text{ pA}$, $\text{Cs}^+_{\text{Na}} = 30 \text{ mM}$). Die Haltestromverschiebung beim Anblasen ist identisch mit der Verschiebung, die beim Umhängen der Badperfusion auf die Anblaslösung gemessen wird. Die Anblaseffekte sind DHO -hemmbar. $T: 31,9^\circ\text{C}$.

49 min $\pm$ 12 (n = 3) gemessen. Aus diesen Zahlenwerten ergab sich eine signifikant kleinere ($p < 0,05$) Pumpenstromabnahme bei interner Perfusion mit Mg-haltiger Lösung als bei Verwendung von Mg-freier Lösung.

3.4.3 - von der extrazellulären K- und Cs-Konzentration

In der vorliegenden Arbeit werden die intra- und extrazellulären K-Ionen zum größten Teil durch Cs-Ionen ersetzt. Auf diese Weise wird die K-Leitfähigkeit der Membran blockiert. Gleichzeitig ist extrazelluläres Cs ein Aktivator der Pumpe. Im folgenden werden die aktivierende Wirkung von extrazellulären K- und Cs-Ionen auf I_p in einem Bereich von 0 bis 20 mM verglichen.

Zur Erstellung einer Konzentrations-Wirkungs-Kurve wird jeweils die I_p -Amplitude bei einer geringen Konzentration von K⁺ oder Cs⁺ in der Badlösung mit dem I_p -Wert bei der entsprechenden maximalen Konzentration des Ions in der Anblaspipette verglichen. Die Originalregistrierungen und das Auswerteverfahren sind in Abb. 19 dargestellt. Im Bad werden Lösungen mit 1 mM K_o (oberer Teil), 2 mM K_o (mittlerer Teil) und 4 mM K_o (unterer Teil) verwendet. Es wird jeweils eine Lösung mit 10 mM K_o angeblasen. Alle Lösungen sind bis auf die K- und TEA-Konzentration identisch (siehe Abschnitt 2.2.3). Am Ende eines jeden Experimentes wird der Badlösung DHO (Endkonzentration $2 \cdot 10^{-4}$ M) zugegeben. Die daraus resultierende Haltestromverschiebung in Einwärtsrichtung wird als Maß für den Pumpenstrom in der jeweiligen Badlösung genommen. Dieser Stromwert wird in Relation gesetzt zu dem jeweiligen Pumpenstrom der Zelle unter 10 mM c_{oK}. I_p in 10 mM c_{oK} berechnet sich aus der Haltestromverschiebung in Auswärtsrichtung während des Anblasens plus der Haltestromverschiebung in Einwärtsrichtung unter DHO. Die Pumpenstromwerte in dem oberen Teil von Abb. 19 betragen dementsprechend ca. 30 pA in 1 mM c_{oK} bzw. ca. 65 pA in 10 mM c_{oK}. Vergleichbare Experimente werden mit Cs⁺ als Aktivator der Pumpe durchgeführt. Die Konzentrationen von Cs⁺

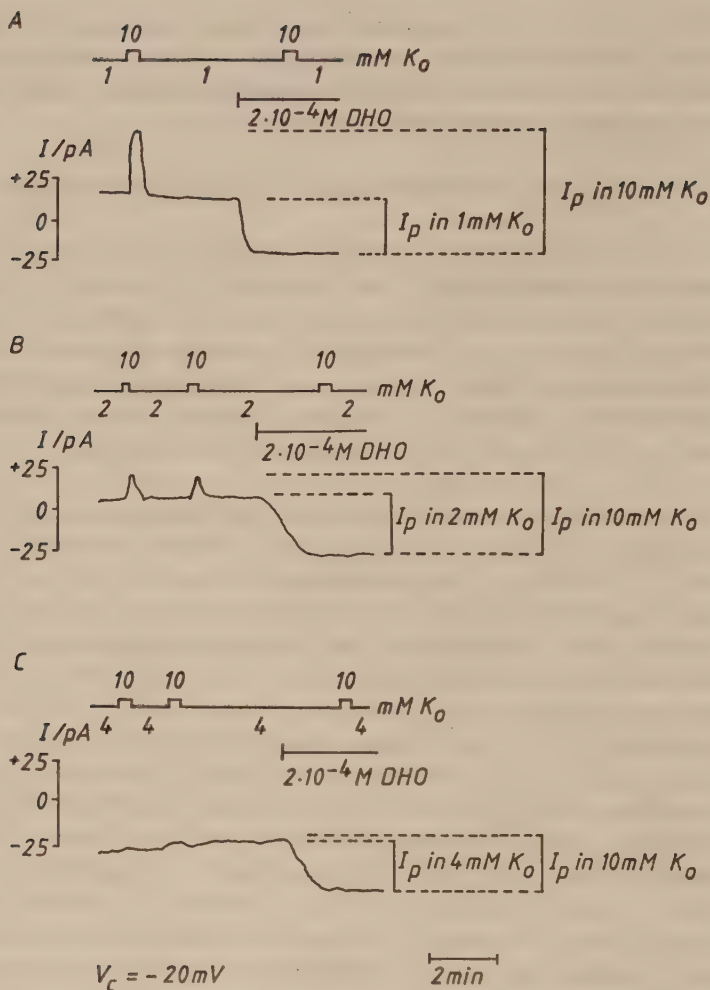


Abb.19 Bestimmung des Pumpenstromes in 1, 2 und 4 mM K_0 im Vergleich zu I_p in externer Lösung mit 10 mM Kalium.

Die obere Spur markiert jeweils den Zeitraum, in dem die Zelle mit 10 mM K-haltiger externer Lösung angeblasen wird. Darunter ist der Zeitraum gekennzeichnet, in dem die Badlösung $2 \cdot 10^{-4}$ M DHO enthält. Die jeweils untere Spur gibt den Haltestrom bei einem Haltepotential von -20 mV wieder. Die Originalregistrierungen stammen von verschiedenen Cardioballs. T: 30-33°C.

in der Badlösung betragen 1,25; 2,5; 5,0 oder 10,0 mM. Die Anblaspipette enthält extrazelluläre Lösung mit 20 mM Cs^+ .

Die Ergebnisse der beschriebenen Versuche sind in Abb. 20 zusammengefaßt. Die Pumpenstromwerte in Lösungen mit 10 mM K_o oder 20 mM Cs_o werden jeweils gleich 1 gesetzt. Die K -aktivierten Pumpenströme ($I_{P\text{K}}, o$) sind auf I_P in 10 mM K_o bezogen angegeben. Die Erhöhung der c°_{K} von 10 auf 20 mM führt nicht zu einer Vergrößerung der Pumpenstromamplitude. Die Cs -aktivierten Pumpenströme ($I_{P\text{Cs}}, \bullet$) sind in Relation zu dem jeweiligen Wert in 20 mM Cs_o aufgetragen. Den Meßpunkten für K_o (o) liegen jeweils 4 und den Meßpunkten für Cs_o ($\bullet$) jeweils 5 Versuche zugrunde. Die Mittelwerte wurden in einem Hill-Diagramm aufgetragen (Abb. 21). Die Exponenten der Gleichungen in Abb. 20 resultieren ebenso aus der Hill-Auftragung wie die $\text{K}_{0,5}$ -Werte. Eine halbmaximale Pumpenstromaktivierung erfolgt bei 1,2 mM K_o oder 3,2 mM Cs_o . Die Hill-Koeffizienten von 1,94 für K_o und 1,73 für Cs_o liegen in dem Bereich von 1 bis 2, wie es bei einem Transport von 2 K^+ pro Pumpenzyklus zu erwarten ist.

Die Pumpenstromdichte in 10 mM K_o beträgt $0,40 \pm 0,18 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($n = 21$). In 20 mM Cs_o wird ein Wert von $0,31 \pm 0,18 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($n = 24$) gemessen. Diese Meßwerte lassen den Schluß zu, daß die Pumpenstromdichte in maximal aktivierenden Cs -haltigen Lösungen geringer ist als in entsprechenden K -haltigen externen Lösungen. Ein Vergleich der Mittelwerte ergibt jedoch keinen signifikanten Unterschied ($p > 0,05$). Ein Grund für die geringe statistische Aussagekraft einer solch großen Anzahl von Experimenten ($n = 21$ bzw. $n = 24$) liegt in der großen Schwankungsbreite der gemessenen Pumpenstromdichten.

Die Wirksamkeit der Aktivatoraktionen Cs^+ und K^+ wird am I_P derselben Zelle vergleichend getestet (Abb. 22). Dabei wird in Badlösung mit 20 mM Cs festgestellt, daß durch das Anblasen der Zelle mit 10 mM K - und 10 mM TEA-haltiger Lösung eine weitere Verschiebung des Haltestromes in Auswärtsrichtung erfolgt. Die Haltestromänderung während des Anblasens tritt unter DHO nicht auf. Die untersuchte

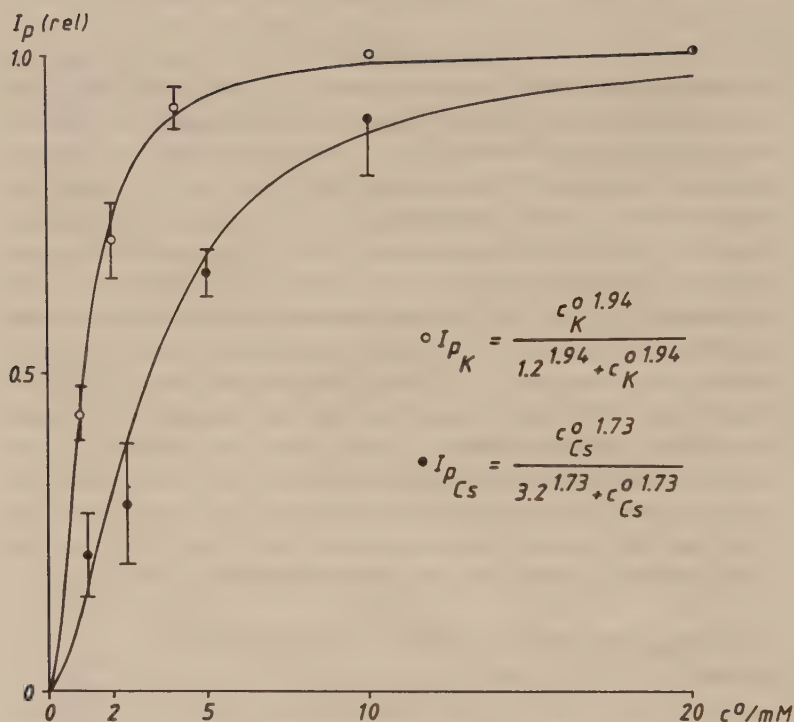


Abb.20 Pumpenstromamplituden von isolierten Purkinjezellen aus dem Schafherzen als Funktion von c^0_K und c^0_{Cs} .

Die I_P -Werte in 1, 2 und 4 mM K_0 sind im Verhältnis zu I_P bei 10 mM K_0 , die I_P -Amplituden in 1,25; 2,5; 5 und 10 mM Cs_0 in Relation zu I_P bei 20 mM Cs_0 aufgetragen. Die I_P -Amplituden in Badlösung mit 10 oder 20 mM Kalium unterscheiden sich nicht. Das Haltepotential beträgt in allen Versuchen -20 mV. Die gezeigten Kurven ergeben sich aus den angegebenen Gleichungen. T: 30-33°C.

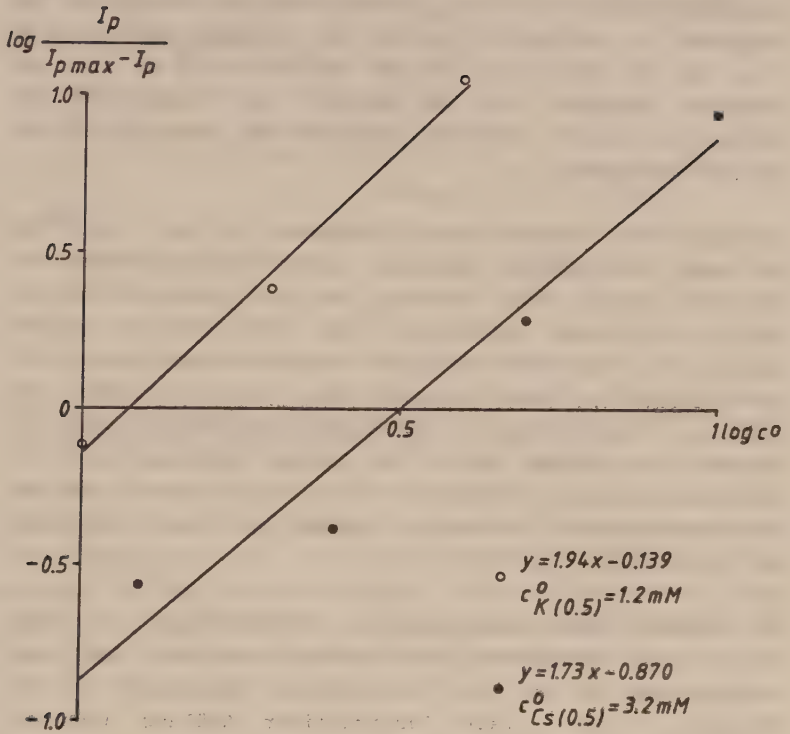


Abb.21 Hill-Diagramm der Meßwerte aus Abb. 20 zur Bestimmung der Hill-Koeffizienten und der halbmaximal aktivierenden K- bzw. Cs-Außenkonzentration ($c_o^{(0.5)}$ und $c_o^{Cs(0.5)}$).

Der Korrelationskoeffizient r beträgt 0,996 für K (○) bzw. 0,975 für Cs (●).

Zelle zeigt also bei Aktivierung mit 10 mM c°_K einen größeren Pumpenstrom als in 20 mM Cs-haltiger Badlösung. An insgesamt 4 Cardioballs betrug der Pumpenstrom in einer c°_{Cs} von 20 mM 72 ± 11 % des Wertes in 10 mM c°_K . In weiteren Versuchen war es möglich, den Pumpenstrom in Lösung mit 10 mM K_2 durch das Anblasen von Lösung mit 20 mM Cs. zu verringern.

Messungen des Pumpenstromes in Lösungen mit mehr als 20 mM Cs. waren ohne größere Änderung in der Zusammensetzung der externen Lösung nicht möglich. Aus dem Kurvenverlauf in Abb. 20 ist jedoch ersichtlich, daß I_p in 20 mM Cs. nahezu maximal ist. Der Unterschied der Pumpenstromamplitude in 10 oder 20 mM c°_{Cs} macht nur wenig mehr als ein Zehntel des maximalen Pumpenstromes aus. In den Versuchen für Abb. 20 beträgt die Zunahme von I_p bei einer Erhöhung der Cs.-Konzentration von 6 auf 20 mM 37 % ($V_c = -20$ mV). In den Versuchen der Abb. 30 nimmt I_p dagegen von 6 nach 40 mM Cs. um 34 % zu ($V_c = -40$ mV).

Es wurden Kontrollexperimente durchgeführt, um eine quantitative Bestimmung der Durchmischung von Bad- und Anblaslösung an der Zelle vorzunehmen. Ausgehend von der Erkenntnis, daß nach langfristiger Spülung (mehrere Minuten) die Einzelzellen in Lösungen ohne Aktivator-kationen (20 mM TEACl) keinen DHO-hemmbarer Strom mehr aufweisen (Abb. 27), wurde versucht, I_p durch das Anblasen einer solchen Lösung zu hemmen. Wie Abb. 23 zeigt, sind die Haltestromwerte während des Anblasens nicht mit dem Haltestrom unter DHO identisch. Aus der Differenz zwischen den beiden Werten wurde versucht, die aktuelle mittlere Cs-Konzentration an der Zelloberfläche zu bestimmen. Nimmt man das Verhältnis von I_p in 5 mM c°_{Cs} zu dem gemessenen Pumpenstrom in der nominell Cs-freien Lösung, so läßt sich mit Hilfe der in Abb. 20 gezeigten Cs-Kurve (●) eine mittlere c°_{Cs} bestimmen. Diese mittlere c°_{Cs} resultiert aus der Durchmischung von Anblas- und Badlösung und entspricht dem gemessenen I_p während des Anblasens. Aus 4 Versuchen ergibt sich ein Verhältnis der Anblas- zur Badlösung von 71 : 29. Das heißt, an der Außenseite der

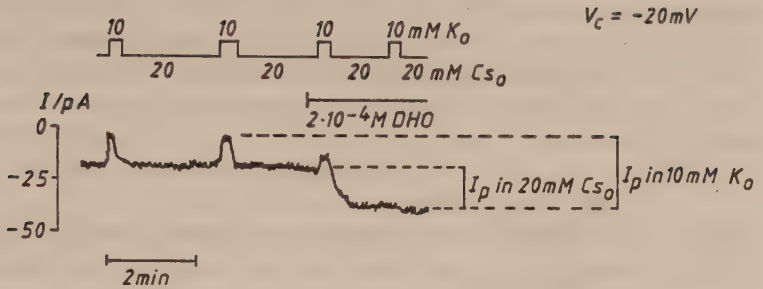


Abb.22 Pumpenstrom einer isolierten Purkinjezelle in externer Lösung mit 20 mM Cs_o und 10 mM K_o .

Auf der oberen Spur sind die Zeiträume dargestellt, in denen die Zelle mit 10 mM K-haltiger Lösung angeblasen wird. Darunter ist die Zeitspanne gekennzeichnet, in welcher die Badlösung zusätzlich $2 \cdot 10^{-4} M$ DHO enthält. Die untere Spur zeigt die Originalregistrierung des Haltestroms bei einem Haltepotential von -20 mV. T: 31,2°C.

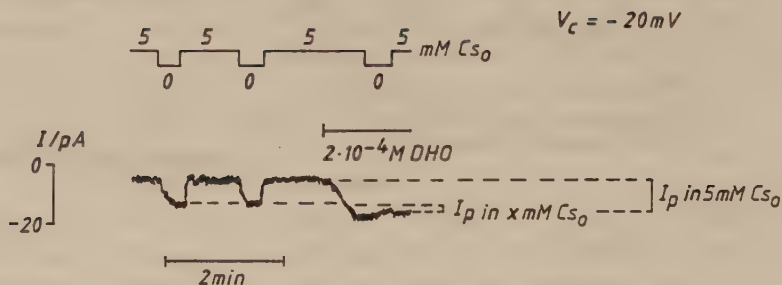


Abb.23 Versuch zur Bestimmung der Durchmischung von Bad- und Anblaslösung.

Die obere Spur zeigt die Zeiten, zu denen ein Cardioball in Cs-haltiger Badlösung (5 mM Cs_0) mit einer Lösung ohne extrazelluläres Aktivator kation angeblasen wird. Während des dritten Anblasvorganges enthält die Badlösung zusätzlich $2 \cdot 10^{-4} \text{ M DHO}$. Der Haltestrom bei -20 mV während der ersten beiden Anblasvorgänge wird mit dem unter DHO verglichen. Die Differenz ist der Pumpenstrom bei einer unbekannten Cs-Konzentration an der Außenseite der Zellmembran (I_p in $x \text{ mM } c^o_{Cs}$). Wird die in Abb. 20 gezeigte Abhängigkeit des Pumpenstromes von c^o_{Cs} in dem Bereich bis 5 mM als linear angenommen, so läßt sich aus dem Verhältnis der beiden gemessenen Pumpenströme die unbekannte Cs-Konzentration während des Anblasvorganges berechnen ($x \text{ mM } c^o_{Cs} = 5 \text{ mM } c^o_{Cs} \cdot I_p \text{ in } x \text{ mM } c^o_{Cs} / I_p \text{ in } 5 \text{ mM } c^o_{Cs}$). x beträgt in diesem Registrierbeispiel 1 mM, d.h. die Lösung an der Zelloberfläche setzt sich im Mittel während des Anblasvorganges aus 8 Teilen Anblas- und 2 Teilen Badlösung zusammen (Effektivität des Anblasvorganges 80 %). T: $31,5^\circ\text{C}$.

Zellmembran liegt beim Anblasen ein Gemisch von 71 Volumenprozent Anblaslösung und 29 Volumenprozent Badlösung vor. Dadurch kann es bei niedrigen c^o_K und c^o_{Cs} zu einer geringen Überschätzung der Pumpenstromdichten kommen, weil die maximale Aktivierung statt mit 10 mM K_o oder 20 mM Cs_o eventuell nur mit $\approx 7,5$ mM K_o oder $\approx 14,5$ mM Cs_o erfolgt und folglich leicht unterschätzt ist.

3.5 Die Pumpenstrom-Spannungs-Beziehung und ihre Beeinflussung durch die Na_i- und Cs_o-Konzentration

Für die Aufnahme von Pumpenstrom-Spannungs-Beziehungen wurde meistens auf die mehrfache interne Perfusion verzichtet. Deshalb wurde für die verschiedenen intrazellulären Na-Konzentrationen jeweils eine größere Anzahl von Einzelzellen untersucht.

Abb. 24 zeigt Strom-Spannungs-Beziehungen in einer Originalregistrierung (Stromspur). Die I-V-Beziehungen werden an einer Einzelzelle vor (A), während (B) bzw. nach (C) der Gabe von DHO registriert. Die Klemmschritte erfolgen von einem Haltepotential ($V_c = -40$ mV) aus für jeweils 800 ms auf die angegebenen Potentialwerte. Aus Abb. 24 ist ersichtlich, daß die gesamte I-V-Beziehung der Einzelzelle durch DHO reversibel in Einwärtsrichtung verschoben wird. Dieser Effekt ist durch die Blockierung des Pumpenstromes zu erklären. Die Verschiebung des Haltestromes in Einwärtsrichtung in C im Vergleich zu A ist wahrscheinlich auf eine Zunahme des Leckstromes zurückzuführen.

Die Auswertung der Originalregistrierung aus Abb. 24 ist in den Abbildungen 25 und 26 gezeigt. Die obere Kurve in Abb. 25 basiert auf dem Mittelwert der beiden Kontroll-I-V-Beziehungen (vor $\blacktriangle$ und nach $\diamond$ Gabe von DHO). Die untere Kurve zeigt die I-V-Beziehung unter DHO.

In Abb. 26 sind zwei verschiedene Verfahren zur Bestimmung der Pumpenstrom(I_P)-Spannungs(V)-Beziehung dargestellt. Die obere I_P -V-Kurve (o) ergibt sich aus dem Differenzbetrag

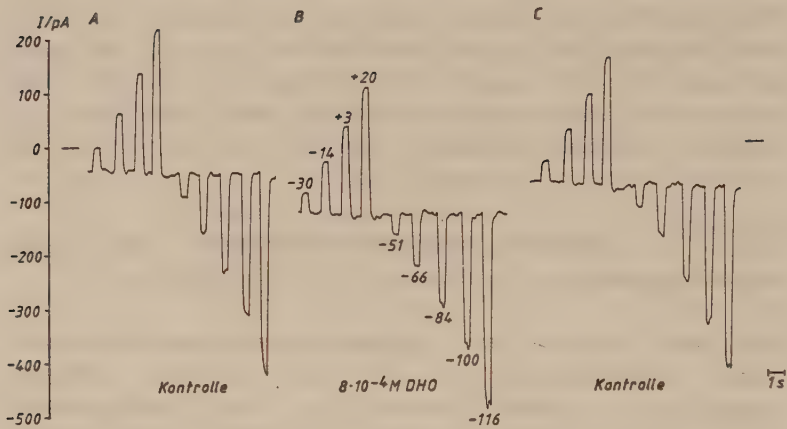


Abb.24 Originalregistrierungen von Strom-Spannungs-Beziehungen eines Cardioballs aus einer Purkinjefaser.

A und C: Kontroll-Strom-Spannungs-Beziehungen vor bzw. nach DHO-Gabe.

B: I-V-Beziehung unter $8 \cdot 10^{-4}$ M DHO. Die Zahlenwerte in B (Angabe in mV) beziehen sich auf das Membranpotential, auf welches für 800 ms geklemmt wird, ausgehend von -40 mV. Die mV-Werte gelten entsprechend auch für A und C. Unter DHO kommt es zu einer reversiblen Einwärtsverschiebung der I-V-Beziehung. Cl_{Na} : 50 mM. T: 32°C.

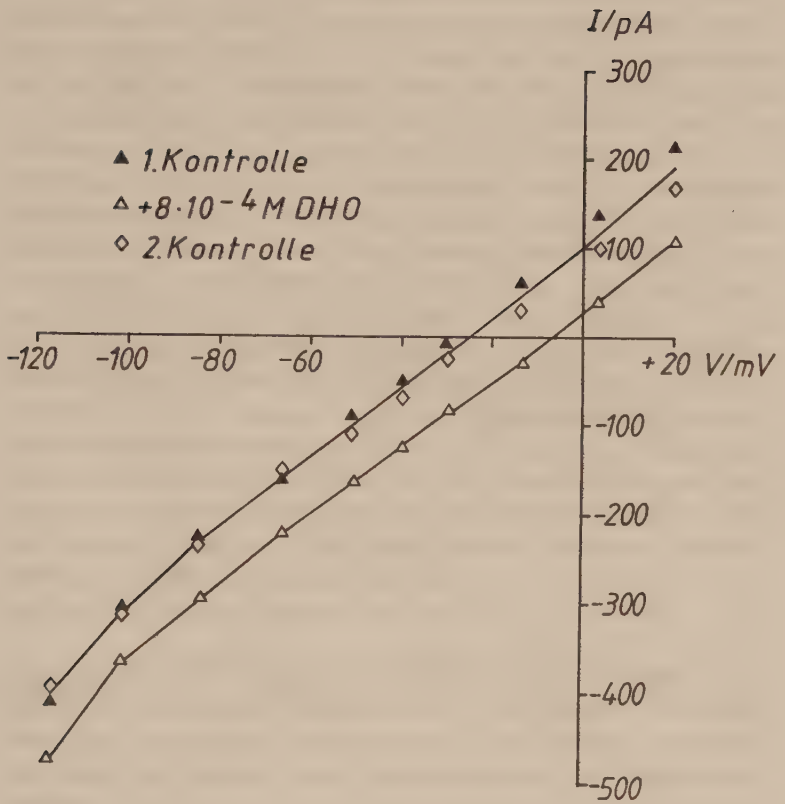


Abb. 25 Strom-Spannungs-Beziehungen zur Bestimmung der Spannungsabhängigkeit von I_p .

Aufgetragen sind die I-V-Beziehungen aus Abb. 24.

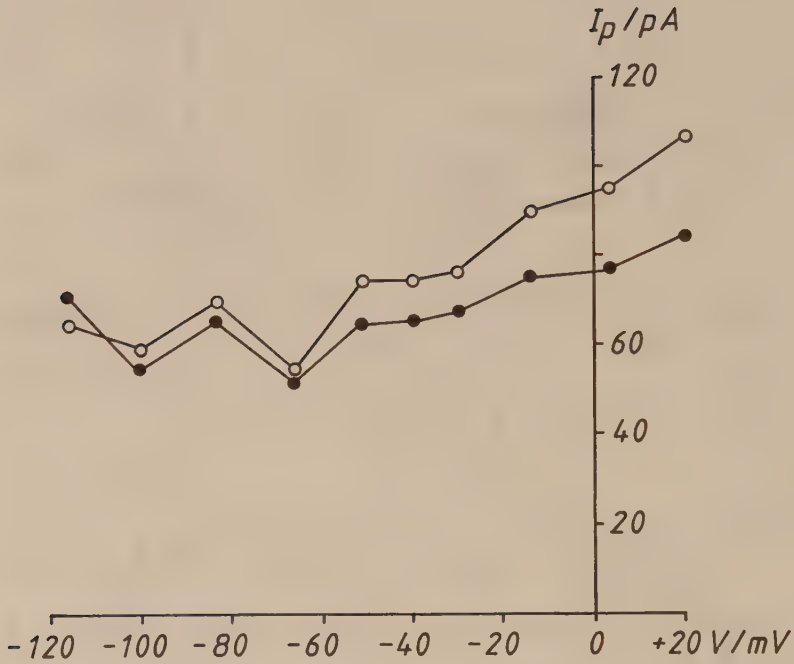


Abb.26 I_p -V-Beziehungen einer isolierten Purkinjezelle.

Die I_p -V-Beziehungen wurden auf zwei verschiedene Weisen aus den Kurven in Abb. 25 berechnet.

zwischen der Kontroll-I-V-Beziehung vor DHO-Gabe und der I-V-Beziehung unter DHO. Die untere I_P -V-Beziehung (●) stellt die Differenz zwischen den beiden in Abb. 25 gezeigten Kurven dar. Die Differenzbildung mit dem Mittelwert der Kontrollen (●) hat ebenso Vor- und Nachteile wie die Differenzbildung mit der Kontrolle vor DHO-Gabe (○). Der Vorteil des letztgenannten Verfahrens liegt in der kurzen Zeitspanne zwischen den Registrierungen der beiden I-V-Beziehungen (ca. 1 min). Der Nachteil besteht darin, daß eventuelle, zeitabhängige Änderungen der Membranleitfähigkeit nicht berücksichtigt werden. Die Differenzbildung mit dem Mittelwert der beiden Kontrollen berücksichtigt diese zeitabhängigen Änderungen der I-V-Beziehungen. Trotzdem ist auch diese Methode nicht optimal um zeitabhängige Verschiebungen zu korrigieren, weil die 2. Kontroll-I-V-Beziehung erst 5 bis 10 Minuten nach der DHO-Gabe registriert werden kann. Die langen Auswaschzeiten des DHO werden durch die für Herzglykoside typische, relativ niedrige Geschwindigkeitskonstante der Abdissoziation verursacht (vergl. Cohen et al. 1987).

Angesichts der genannten Schwierigkeiten wurde nach Möglichkeit folgende Methode zur Bestimmung der I_P -V-Beziehung angewendet. Die Mittelung der beiden in Abb. 26 gezeigten Kurven ergab eine Gewichtung der 1. Kontrolle vor DHO-Gabe mit einem Faktor von 3 gegenüber der 2. Kontrolle nach DHO-Gabe. Dieses Verfahren berücksichtigt die unterschiedlichen Zeitspannen zwischen den Registrierungen der Kontroll-I-V-Beziehungen und der I-V-Beziehung unter DHO.

Die beschriebene Auswertung ergab die in Abb. 29 und 30 gezeigten Ergebnisse. Es wurden nur Experimente berücksichtigt, in denen auch eine Kontroll-I-V-Beziehung nach DHO-Gabe aufgenommen werden konnte. Außerdem wurden Versuchsprotokolle verworfen, wenn die Differenz zwischen den beiden Kontroll-I-V-Beziehungen größer war als die Differenz zwischen der 1. Kontrolle und der I-V-Beziehung unter DHO.

Das Ausbleiben nennenswerter Änderungen "passiver" Membranstromkomponenten nach DHO-Gabe konnte in Abb. 12 nur für das Haltepotential von -39 mV gezeigt werden. Bevor jedoch Strom-Spannungs-Beziehungen über einen größeren Potentialbereich ausgewertet werden können, muß die Wirkung von DHO auf Membranströme untersucht werden, die bei -39 mV möglicherweise nicht aktiviert sind. Die Anwendung einer externen Lösung ohne Aktivatoraktionen hatte bei -20 mV an einer kugelförmigen Einzelzelle mit einer Oberfläche ohne Einfaltungen (Invaginationen) eine nahezu vollständige Hemmung des DHO-sensitiven Stromes zur Folge (Abb. 17). Für den Potentialbereich von -120 bis $+20$ mV ist in Abb. 27 dargestellt, daß DHO, nach Blockierung der Na/K-Pumpe in K-freier Lösung, keine nennenswerten Änderungen der Membranströme verursacht. Die gemessenen Unterschiede im Strom bewegen sich im Bereich statistischer Schwankungen, wie sie auch ohne Lösungswechsel innerhalb von 2-3 Minuten auftreten.

In Abb. 28 ist die Änderung der I_P -V-Beziehung durch Erhöhung der intrazellulären Na-Konzentration dargestellt. Die I_P -V-Beziehung mit c^i_{Na} 10 mM ($\bullet$) hat bei -40 mV eine Pumpenstromdichte von $0,82 \mu A \cdot cm^{-2}$. Die Pumpenstromdichte erhöht sich nach dem Austausch gegen eine interne Lösung mit 50 mM Na auf $1,4 \mu A \cdot cm^{-2}$. Die Form der Pumpenstrom-Spannungs-Beziehung wird nicht wesentlich verändert. Eine bessere Vergleichsmöglichkeit bietet die Auftragung der relativen Pumpenstromdichte. Hierzu wird der jeweilige I_P -Wert bei einem bestimmten Membranpotential gleich 1 gesetzt. Alle anderen Werte der I_P -V-Beziehung werden im Verhältnis zu diesem Wert aufgetragen.

Die Auswirkungen einer Variation von c^i_{Na} zwischen 5 und 50 mM auf die Form der I_P -V-Beziehung wurden untersucht. Ein Teil der Ergebnisse ist in Abb. 29 dargestellt. Da die I_P -V-Beziehung in 30 mM c^i_{Na} ($n = 1$) zwischen den I_P -V-Beziehungen in 10 und 50 mM c^i_{Na} liegt, wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit auf ihre Darstellung verzichtet. Die Pumpenstromdichten bei $+20$ mV und der jeweiligen c^i_{Na} wurden gleich 1 gesetzt. Alle anderen I_P -Dichten bei den

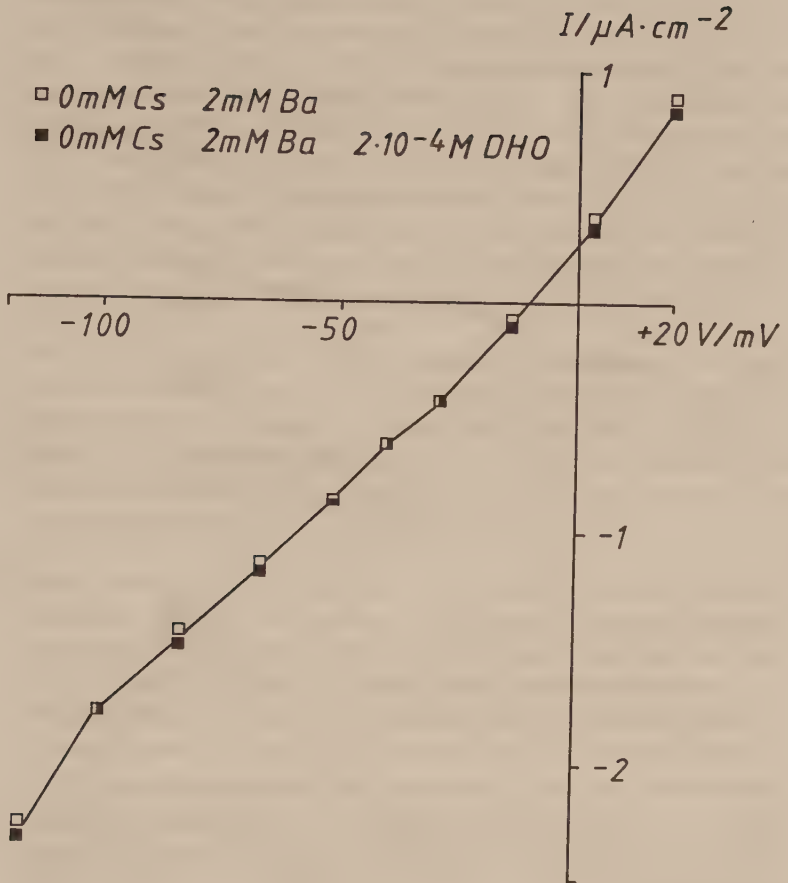


Abb.27 Strom-Spannungs-Beziehungen eines Cardioballs in Lösungen ohne Aktivator-kation, mit oder ohne DHO.

Aufgetragen ist die Stromdichte am Ende eines 800 ms-Pulses gegen das geklemmte Membranpotential. Wegen der geringen Unterschiede sind die Meßpunkte (□ und ■) durch dieselbe Kurve verbunden.

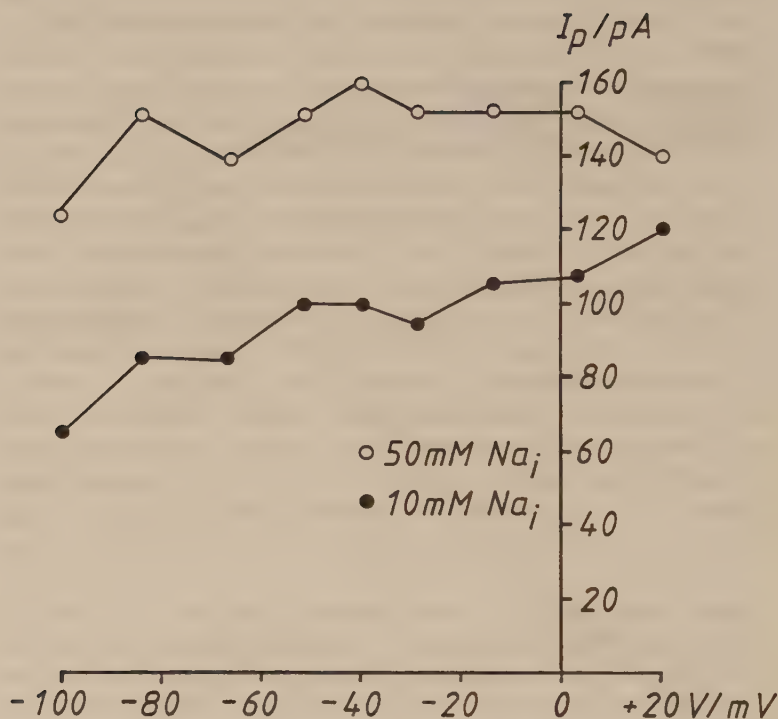


Abb.28 I_p -V-Beziehungen einer isolierten Purkinjezelle (4 Tage in Kultur) bei zwei unterschiedlichen intrazellulären Na-Konzentrationen.

Die Differenz zwischen den I-V-Beziehungen direkt vor der DHO-Gabe und unter DHO ist aufgetragen gegen das geklemmte Membranpotential. Ausgehend von einem Haltepotential von -40 mV wird für jeweils 800 ms auf das angegebene Potentialniveau geklemmt. Zuerst wird der DHO-sensitive Strom bei 10 mM c'_{Na} bestimmt. Bei interner Perfusion einer Lösung mit 50 mM Natrium kommt es zu einer Verschiebung des Haltestromes in Auswärtsrichtung und zu einer Vergrößerung des DHO-sensitiven Stromes (vergl. Abb. 12). T: 32°C.

verschiedenen Haltepotentialen sind in Relation zu dem entsprechenden Wert bei +20 mV aufgetragen. Die obere Kurve (o) zeigt die mittlere Pumpenstromdichte von 5 Purkinjezellen mit einer c_{Na}^i von 50 mM. Die absolute Pumpenstromdichte beträgt bei +20 mV $1,14 \pm 0,38 \mu A \cdot cm^{-2}$ ($n = 5$). Die in einem Potentialbereich von +20 bis -14 mV konstante Pumpenstromdichte nimmt zu negativeren Werten hin ab. Bei einem Membranpotential von -116 mV ist die I_P -Dichte mit einem Wert von $0,62 \pm 0,29$ signifikant vom Wert bei +20 mV verschieden ($p < 0,05$).

Bei einer c_{Na}^i von 10 mM ergaben 6 Messungen (●) eine Pumpenstromdichte von $0,87 \pm 0,35 \mu A \cdot cm^{-2}$ bei +20 mV. Die untersuchten Cardioballs zeigen von +20 bis -116 mV zu negativeren Potentialen hin eine leichte Abnahme der Pumpenstromdichte. Bei -116 mV beträgt sie noch $0,65 \pm 0,13$ des Ausgangswertes bei +20 mV.

Sechs Purkinjezellen wurden mit einer 5 mM Na-haltigen internen Lösung perfundiert (□). Die Pumpenstromdichte dieser Zellen beträgt $0,28 \pm 0,11 \mu A \cdot cm^{-2}$ bei +20 mV. Von +20 mV aus bis -40 mV nimmt die Pumpenstromdichte nur geringfügig ab (vergl. 10 mM Na_i , ●). Die Amplitude des Pumpenstromes ist aber in einem Bereich von -40 bis -100 mV stark potentialabhängig und verringert sich mit zunehmender Hyperpolarisation der Zellmembran. Bei -100 mV beträgt die Pumpenstromdichte $0,34 \pm 0,07$ des Wertes bei +20 mV. Negativ von -100 mV sind zuverlässige I_P -Bestimmungen bei 5 mM c_{Na}^i kaum möglich, da die absoluten Pumpenströme hier sehr gering sind. Die Pumpenströme bei -84 und -100 mV sind signifikant kleiner als die entsprechenden Ströme in Zellen mit 50 mM Na_i ($p < 0,05$, durch Stern markiert in Abb. 29).

Die in Abb. 29 gezeigten Ergebnisse lassen folgende Rückschlüsse zu: Die Abhängigkeit der Pumpenstromdichte vom Membranpotential nimmt zu mit abnehmender c_{Na}^i und/oder ansteigendem chemischen Gradienten, gegen welchen die Kationen transportiert werden. Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten unterscheiden zu können, wurden I_P -V-

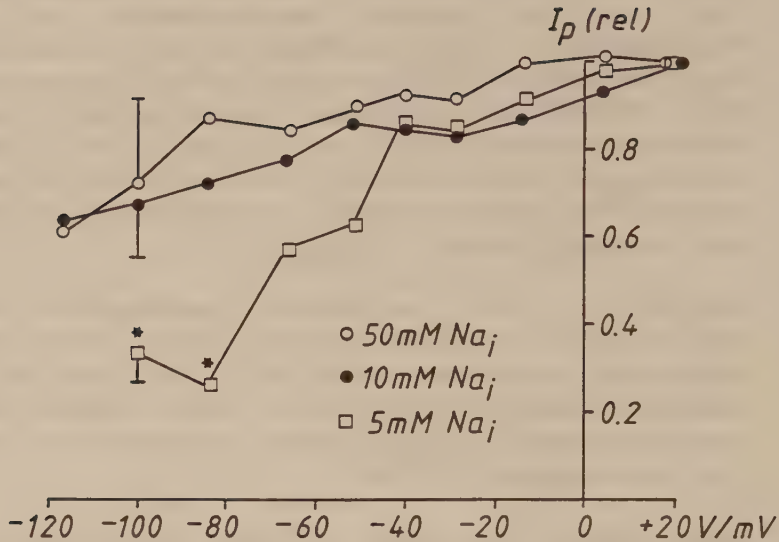


Abb.29 Pumpenstrom-Spannungs-Beziehungen von isolierten Purkinjezellen aus dem Schafherzen bei unterschiedlichen c'_{Na} .

Die Pumpenstromamplitude wird am Ende eines 800 ms-dauernden Spannungspulses gemessen und, relativ zu dem Wert bei +20 mV, gegen das entsprechende Membranpotential aufgetragen. Das Haltepotential beträgt -40 mV. Die gezeigten Mittelwerte stammen von 5 oder 6 Zellen. Die Standardabweichung der Mittelwerte ist exemplarisch bei -100 mV eingezeichnet. Die Sterne markieren I_p -Werte, die signifikant ($p < 0,05$) von den I_p -Werten bei 50 mM c'_{Na} verschieden sind. ($c^o_{Na} = 100$ mM).

Beziehungen bei konstanter c_{Na}^i und c_{Na}^o (konstanter Na-Gradient), aber variierendem Cs-Gradienten (konstante c_{Cs}^i) registriert. Die Na-Konzentration betrug intrazellulär 13 mM und extrazellulär 100 mM. Die interne Lösung enthielt 120 mM Cs und die extrazelluläre Lösung 6 oder 40 mM Cs. Um den gleichen maximalen Gradienten für das extrazelluläre Aktivatorkation Cs zu erzielen, wie für das intrazelluläre Aktivatorkation Na, wurden 6 mM Cs. gegenüber 120 mM Cs_i verwendet (vergl. Abb. 29, 5 mM Na_i gegenüber 100 mM Na_o). Abb. 30 zeigt analog zu Abb. 29 die Resultate der Experimente mit variierender c_{Cs}^o . Es sind die I_P -V-Beziehungen für c_{Cs}^o 6 mM (●) und 40 mM (○) dargestellt. Die absoluten Pumpenstromdichten betragen in externer Lösung mit 6 mM Cs $0,53 \pm 0,24 \mu A \cdot cm^{-2}$ ($n = 6$) und mit 40 mM Cs $0,51 \pm 0,14 \mu A \cdot cm^{-2}$ bei +20 mV ($n = 7$). Der bei +20 mV geringfügig höhere Pumpenstrom in der niedrigeren c_{Cs}^o ist nicht typisch und beruht wahrscheinlich auf einer statistischen Schwankung. Bei einer größeren Anzahl von Zellen wurde die Pumpenstromdichte bei -40 mV bestimmt. Für 6 mM Cs. ergab sich ein Wert von $0,44 \pm 0,19 \mu A \cdot cm^{-2}$ ($n = 22$) gegenüber $0,59 \pm 0,23 \mu A \cdot cm^{-2}$ ($n = 15$) für 40 mM Cs_o. Die I_P -V-Beziehung in der externen Lösung mit 40 mM Cs zeigt vergleichbar der I_P -V-Beziehung für 50 mM Na_i (Abb. 29, ○) eine geringe Spannungsabhängigkeit. Dagegen ist in der I_P -V-Beziehung bei 6 mM c_{Cs}^o negativ von -30 mV eine deutliche Abnahme der relativen Pumpenstromdichte zu verzeichnen. Für Membranpotentiale negativ zu -83 mV ergeben sich Werte, die signifikant kleiner sind als 1 ($p < 0,05$, d.h. von dem Wert bei +20 mV verschieden). Der Stern bei -115 mV deutet darauf hin, daß dieser Wert mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % ($p < 0,05$) von dem entsprechenden Wert bei 40 mM Cs. verschieden ist. Die restlichen Meßwerte in dem Potentialbereich von -83 bis -115 mV sind mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit p zwischen 0,05 und 0,1 von den entsprechenden I_P -Werten bei 40 mM Cs. verschieden. Abb. 30 zeigt, daß mit einer Erhöhung des chemischen Gradienten, gegen den die Kationen transportiert werden müssen, die Spannungsabhängigkeit des Pumpenstromes zunimmt.

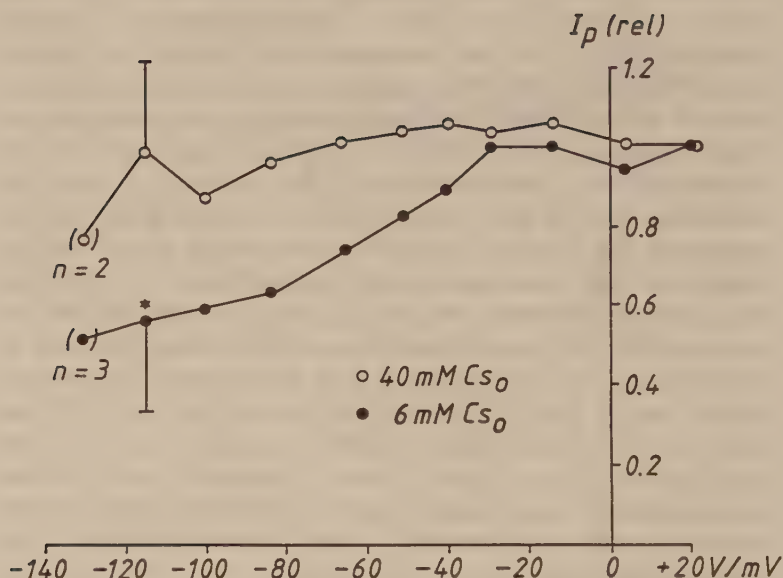


Abb. 30 I_P -V-Beziehungen von isolierten Purkinjezellen aus dem Schafherzen bei 2 verschiedenen $c^\circ Cs$.

Die Pumpenstromamplitude wird am Ende eines 800 ms-dauernden Spannungspulses bestimmt und, in Relation zur I_P -Amplitude bei +20 mV, gegen das jeweilige Membranpotential aufgetragen. Das Haltepotential beträgt -40 mV. Soweit nicht anders angegeben, liegen den Meßpunkten Experimente an 6 oder 7 Einzelzellen zugrunde. Die Standardabweichung der Mittelwerte wird exemplarisch bei -115 mV dargestellt. Der Stern kennzeichnet einen I_P -Wert in 6 mM $c^\circ Cs$, mM, der signifikant ($p < 0,05$) von der entsprechenden I_P -Amplitude in 40 mM $c^\circ Cs$ verschieden ist. Der Na-Gradient über der Zellmembran ist konstant ($c^i Na = 13$ mM, $c^\circ Na = 100$ mM). ($c^i Cs = 120$ mM).

IV. Diskussion

4.1 Isolierung und Kultivierung von Purkinjezellen aus dem Schafherzen

Aus den Herzen adulter Warmblüter sind bereits mehrere Zelltypen isoliert und kultiviert worden. Ventrikelzellen (Claycomb & Palazzo 1980, Schwarzfeld & Jacobson 1981, Piper et al. 1982) und Vorhofzellen (Bechem et al. 1983) können in einer großen Anzahl isoliert werden. Die adulten Zellen teilen sich nicht mehr und sind leicht von anderen Zelltypen (z.B. proliferierenden Fibroblasten) in der Zellkultur zu unterscheiden. Die Isolierung von Zellen aus dem Reizleitungssystem des Warmblüterherzens ist wesentlich schwieriger, da die Gewebeabschnitte kleiner sind und meist keine Abgrenzung zum benachbarten Gewebe zu erkennen ist. Die Zellkulturen des Sinus- und Atrioventrikularknotens (DiFrancesco et al. 1979, Taniguchi et al. 1981, Nakayama et al. 1984, Nathan 1986) enthalten daher auch Vorhof- bzw. Ventrikelzellen. Es ist schwierig, z.B. kultivierte Sinuszellen von gleichzeitig mitisolierten Vorhofzellen zu unterscheiden. Purkinjefäden, welche die Endverzweigung des Reizleitungsgewebes bilden, sind dem Warmblüterherzen zwar leicht zu entnehmen, aber die ausgeprägte Bindegewebshülle bildet ein erhebliches Hindernis bei der Isolierung der Purkinjezellen.

Mit kleinen Modifizierungen der beschriebenen Isolierungsmethode für Purkinjeeinzelzellen aus Schafherzen können auch Zellen aus Purkinjefäden des Kaninchens und des Rindes isoliert werden. Bei Purkinjezellen aus Kaninchenherzen erhält man nur eine geringe Anzahl isolierter Einzelzellen. Die Isolierung der gleichen Zellen aus Rinderherzen ist zwar wesentlich problemloser, doch sind die abgerundeten Einzelzellen im Mittel zu groß für Patch-clamp-Messungen mit der Einzelelektroden-Spannungsklemme und interner Perfusion. Als ideales Präparat haben sich die Cardioballs aus Purkinjefäden des Schafherzens erwiesen. Sie haben einen mittleren Durchmesser von ca. 50 μm in ihrer abgerundeten Form (siehe

Abb. 8A) und lassen bei einem hohen Abdichtwiderstand eine uniforme Spannungsklemme zu.

Die Verwendung von Purkinjefäden aus dem Schafherzen ermöglicht eine kostengünstige Zellpräparation. Die Purkinjefäden von ca. 10 Schafherzen ergeben 15-20 Zellkulturen mit einer Dichte von mehreren hundert Zellen pro Kulturschälchen. Das Versuchsmaterial wurde kostenlos am örtlichen Schlachthof erhalten.

Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß von dem Purkinjefaden des Schafherzens, einem Standardpräparat in der Elektrophysiologie, schon sehr viele Meßdaten vorliegen. Dadurch wird ein Vergleich zwischen den Einzelzellen und dem multizellulären Präparat ermöglicht, ohne daß Speziesunterschiede berücksichtigt werden müssen. Es konnten keine Unterschiede in den untersuchten Eigenschaften zwischen Einzelzellen und Purkinjefasern festgestellt werden, die auf eine Schädigung von Membranbestandteilen durch die verwendeten Enzyme während der Zellisolierung zurückzuführen wären.

Abgerundete Einzelzellen nach 1-7 Tagen in Kultur (Cardioballs) haben sich als geeignet für elektrophysiologische Experimente erwiesen. Die Abrundung der isolierten Zellen ist nicht auf eine Kontraktur der Zellen infolge einer Schädigung zurückzuführen (vergl. Isenberg & Klöckner 1982a). Es wurden nur die Zellen als intakt angesehen, die im frischisolierten Zustand, direkt nach dem Ausstreichen aus der Bindegewebshülle, noch eine längliche, kantige Form, eine Querstreifung und keine Membranblasen aufwiesen. Geschädigte Zellen dagegen zeigten Membranblasen, eine granuläre Struktur des Cytoplasmas und eine heftige Spontanaktivität, meist bis zum Zelltod. Die Kultivierbarkeit und die Redifferenzierung der Einzelzellen sprechen für den intakten Zustand und die Lebensfähigkeit der Cardioballs.

Während der Zellisolierung ist grundsätzlich darauf zu achten, daß eine Temperatur von 35-37°C ohne große

Schwankungen eingehalten wird. Außer einer äußerst vorsichtigen manuellen Handhabung sollte auch eine langsame, abgestufte Erhöhung der Ca_0 -Konzentration vorgenommen werden. Eine erfolgreiche Kultivierung von Zellen kann selbstverständlich nur erfolgen, wenn die Isolierung unter sterilen Bedingungen stattgefunden hat.

4.2 Patch-clamp-Messungen an Purkinjezellen

Die isolierten Purkinjezellen zeigen einen spannungsabhängigen Na-Strom I_{Na} , einen spannungsabhängigen Cs-blockierbaren Schrittmacherstrom (vergl. Callewaert et al. 1984), einen spannungsabhängigen, DHO-hemmbareren Na/K-Pumpenstrom (I_{P}) und eine Ba-blockierbare K-Leitfähigkeit.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde der schnelle Na-Einstrom (I_{Na}) nach einer Depolarisation der Zellmembran zu Beginn und am Ende eines jeden Experimentes überprüft. Die schnelle Aktivierung und Inaktivierung dieser Membranstromkomponente diente als Kriterium für einen guten Zugang zum Zellinneren über die Patch-clamp-Pipette.

Der entwickelte Patch-clamp-Elektrodenhalter für die mehrfache interne Perfusion unterscheidet sich von der ursprünglichen Konstruktion (Soejima & Noma 1984) durch folgende Merkmale:

Über einen Quetschring werden polierte Sodaklarglas-Elektroden (Außendurchmesser: 2 mm) an dem Kopf des Elektrodenhalters befestigt und abgedichtet.

Die innere Füllpipette aus einem feinen Plastikschauch mit einem Spitzendurchmesser von ca. 100 μm ist durch einen gefetteten Gummiring abgedichtet und innerhalb der Patch-clamp-Elektrode frei verschiebbar.

Elektrische Signale werden direkt über einen chlorierten Silberdraht (Durchmesser: 0,2 mm) in der internen Lösung am oberen Ende der Patch-clamp-Elektrode zum BNC-Stecker des Elektrodenhalters geleitet.

Vergleichbar zu der ursprünglichen Konstruktion (Soejima & Noma 1984) und den Weiterentwicklungen (Sato et al. 1985, Lapointe & Szabo 1987) sind folgende Eigenschaften:

Ein Teflonschlauch stellt die Verbindung der Füllpipette mit einem Reservoir für interne Lösung her. Der Schlauch kann während eines Experimentes in verschiedene Vorratsbehälter gehängt werden.

Über einen anzulegenden Unterdruck kann die Durchflußgeschwindigkeit der internen Lösung reguliert werden.

Die Verwendung von Gummidichtungen gewährleistet die notwendige Abdichtung des Elektrodenhalters. Im Gegensatz zu dem häufig verwendeten Wachs zur Befestigung der Pipetten ermöglichen Gummiringe einen schnellen und mühelosen Austausch der Patch-clamp-Elektroden.

Die Füllpipetten müssen einen gewissen Minstdurchmesser aufweisen (Innendurchmesser: ca. 60 μm), damit mit einem geringen Unterdruck der Lösungswechsel in der Patch-clamp-Elektrode erfolgen kann. Die Entfernung der Füllpipettenspitze von der Spitze der Patch-clamp-Elektrode wird in erster Linie durch die Form der Patch-clamp-Pipette bestimmt. Das verwendete Sodaklarglas läßt sich besser als andere Glassorten zu stumpfen Pipettenspitzen ausziehen. Deshalb kann die Füllpipette auf 500-700 μm an die Zelle (Spitzenöffnung der Patch-clamp-Elektrode) herangebracht werden, ohne die Elektrodenspitze zu verstopfen. Der beschriebene Elektrodenhalter besitzt, aufgrund der verzweigten Konstruktion, eine größere Eigenkapazität als ein konventioneller Patch-clamp-Elektrodenhalter. Die Eigenkapazität des Halters kann mit einem handelsüblichen EPC-7-Patch-clamp-Verstärker meist nicht kompensiert werden. Deshalb muß auf eine kapazitive Bestimmung der Membranoberfläche verzichtet werden.

Die Geschwindigkeit, mit welcher die interne Perfusion der Zelle erfolgt, wird kaum durch die Geschwindigkeit des Lösungswechsels in der Patch-clamp-Elektrode beeinflusst. Limitierend sind der Öffnungsdurchmesser der Patch-clamp-Elektrode und in einigen Fällen die Geometrie der

Einzelzellen (W. Trautwein, persönliche Mitteilung), z.B. langgestreckte und/oder verzweigte, frischisolierte Sinus-, Vorhof- und Ventrikelzellen.

Als Maß für die Pumpenaktivität wird der DHO-sensitive Strom genommen. Die Experimente ohne intra- oder extrazelluläres Aktivator-kation des aktiven Na-Transportes (Abb. 13, 17 und 27) zeigen, daß DHO keine andere Wirkung hat als eine spezifische Hemmung der Na/K-Pumpe. Die verwendeten DHO-Konzentrationen von 2 bis $8 \cdot 10^{-4}$ M bewirken bei extrazellulären Aktivator-konzentrationen von bis zu 20 mM wahrscheinlich eine vollständige Hemmung der Na/K-ATPase. Cohen und Mitarbeiter (1987) haben eine halbmaximale Hemmung des aktiven Na-Transportes bei $4 \cdot 10^{-6}$ M DHO an isolierten Purkinjezellen aus dem Hundeherzen ($c^{\circ}_{\text{K}} = 8$ mM) festgestellt.

4.3 Abhängigkeit des aktiven Na-Transportes

4.3.1 - von der intrazellulären Na-Konzentration

Die durchgeführten Messungen lassen den Schluß zu, daß der Pumpenstrom in Form einer Sättigungskinetik von der intrazellulären Na-Konzentration abhängig ist (vergl. Abb. 14). Der Pumpenstrom ist bei einer c^i_{Na} von 9 mM halbmaximal aktiviert ($V_c = -40$ mV, $n_s = 1,5$). Die genannten Werte stimmen gut mit den Meßdaten von roten Blutkörperchen (Sachs 1970, 1977, Garay & Garrahan 1973) überein. Die in dem Übersichtsartikel von Bonting (1970) genannten $K_{0,5}$ -Werte liegen zwischen 5 und 13 mM. In dem Artikel von Karlish und Stein (1985) wird eine sigmoide oder quasi-hyperbolische Form der Aktivierungskurve in Abhängigkeit von dem verwendeten Gegenion diskutiert. Philipson und Nishimoto (1983) haben an sarcolemmalen Vesikeln aus Hundeherzen an Na/K-Pumpen in der Innenseite-nach-außen-Orientierung eine sigmoide Abhängigkeit bestimmt, mit einem $K_{0,5}$ von 9 mM und $n_s = 2,8$. An Purkinjefäden aus dem Schafherzen haben Schumacher (1986) und Sejersted et al. (1988) mit Na-sensitiven Mikroelektroden I_p als eine sigmoide Funktion von c^i_{Na} mit

einem $K_{0.5}$ von 14,6 bzw. 14 mM und $n_H = 3,6$ bzw. 1,9 gemessen.

Die von Eisner et al. (1981a) und Glitsch et al. (1982) beschriebene lineare Abhängigkeit des Pumpenstromes von c^i_{Na} an Purkinjefäden des Schafherzens widerspricht den hier beschriebenen Ergebnissen nicht, da in den genannten Untersuchungen an dem multizellulären Präparat nur ein begrenzter Konzentrationsbereich untersucht werden konnte. In einem Konzentrationsbereich von einigen mM um die physiologische Na_i -Konzentration ($c^i_{Na} = 8,8$ mM am Purkinjefaden, Krahn 1986) zeigt I_P eine fast lineare Abhängigkeit von c^i_{Na} (Abb. 14) (vergl. Ventrikelzellen: Nakao & Gadsby 1989).

Nakao und Gadsby (1989) fanden an Ventrikelzellen des Meerschweinchens eine Variation von $K_{0.5}$ und n_H für c^i_{Na} in Abhängigkeit vom Membranpotential. Eine Abhängigkeit des $K_{0.5}$ -Wertes vom Membranpotential bedeutet, daß unter physiologischen Bedingungen der $K_{0.5}$ -Wert während eines Aktionspotentials variiert. Dieser Befund ist ein Beispiel für ein Versuchsergebnis, daß nur durch die Anwendung elektrophysiologischer Methoden und nicht durch biochemische Bestimmungen erhalten werden konnte. Bei einer Hyperpolarisation von 0 auf -80 mV steigt $K_{0.5}$ von 7,8 auf 10,7 mM und n_H von 1,6 auf 2,2 (Nakao & Gadsby 1989). Die c^o_{Na} betrug in den Experimenten der genannten Autoren 150 mM. Eine Senkung der c^o_{Na} von 150 auf 0 mM führt unter vergleichbaren Bedingungen zu einer Änderung von $K_{0.5} = 11$ mM, $n_H = 1,4$ auf $K_{0.5} = 10$ mM, $n_H = 1,4$. Karlisch und Stein (1985) beschreiben an Lipidvesikeln mit Na/K-ATPase aus der Schweineniere bei $c^o_{Na} = 100$ mM einen $K_{0.5}$ von 7 mM, $n_H = 1,9$.

In der Arbeit von Eisner et al. (1987) wird vermutet, daß sich die Affinität der Na/K-Pumpe gegenüber dem intrazellulären Na ändert, wenn das intrazelluläre Kalium durch Caesium ersetzt wird. Eine kompetitiv inhibitorische Bindung des intrazellulären Kaliums an die Na-Bindungsstelle (Knight & Welt 1974, Glynn & Karlisch 1975)

könnte auf diese Weise aufgehoben werden und zu einer scheinbar hohen Affinität der Na/K-ATPase für intrazelluläres Natrium führen. Sejersted et al. (1988) diskutieren auch für Purkinjefasern eine Hemmung der Na/K-Pumpe durch intrazelluläres K^+ und Rb^+ in Abhängigkeit von dem Verhältnis c^i_{Na}/c^i_K oder c^i_{Rb} . Sachs (1986) konnte an rekonstituierten roten Blutkörperchen zeigen, daß die apparente Dissoziationskonstante der drei gleichwertigen Na-Bindungsstellen von 2,4 mM auf 5,8 mM ansteigt, wenn die K_1 -Konzentration von 58 auf 175 mM erhöht wird. Gegen eine große Bedeutung der Beeinflussung von $K_{0,5}$ durch die c^i_{Cs} in den vorliegenden Experimenten sprechen die vergleichbaren Werte für $K_{0,5}$ an K-haltigen roten Blutkörperchen (Garay & Garrahan 1973).

Über den exakten Verlauf der Pumpenstromdichte als Funktion von c^i_{Na} (Abb. 14) in dem Bereich von 0 bis 5 mM Na_1 kann anhand der durchgeführten Experimente keine Aussage gemacht werden (vergl. Karlsh & Stein 1985). Die gezeigten Versuchsergebnisse widersprechen daher nicht einer sigmoiden Abhängigkeit des Pumpenstromes von c^i_{Na} . Die interne Perfusion mit Na-freier Lösung (Abb. 13) ergab keinen meßbaren I_P . Der gemessene DHO-sensitive Strom bei $c^i_{Na} = 0$ mM ist nicht signifikant von Null verschieden, d.h. eine Änderung des Haltestromes ist nicht feststellbar.

Da in der vorliegenden Arbeit der DHO-hemmbar Strom als der elektrogene Teil des Na/K-Pumpentransportes betrachtet wird, gibt die Auftragung des Pumpenstromes nur dann die Pumpenaktivität wieder, wenn auch das Kopplungsverhältnis von 3 Na^+ zu 2 K^+ pro Pumpenzyklus konstant bleibt. Eisner et al. (1981a) haben die vorausgesetzte konstante Stöchiometrie von 3 Na^+ zu 2 K^+ pro Pumpenzyklus in einem Bereich von 3,6 bis 22 mM c^i_{Na} am Purkinjefaden nachgewiesen. Die Experimente von Schumacher (1986) am gleichen Präparat lassen den Schluß zu, daß eine Erhöhung der intrazellulären Na-Konzentration auf bis zu 68 mM keinen Einfluß auf das Kopplungsverhältnis der Na/K-Pumpe hat.

Die maximale Pumpenstromdichte liegt bei ca. $1 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ und stimmt gut mit früheren Messungen am Purkinjefaden (Glitsch & Pusch 1984) und an isolierten Ventrikelzellen des Meerschweinchens (Gadsby et al. 1985b) überein. Der Hill-Koeffizient (n_H) von 1,53 zeigt an, daß mehr als ein Natriumion von einem Pumpenmolekül gebunden und transportiert wird.

Aus den Experimenten zur I_r -Abhängigkeit von c'_{Na} (Abb. 14) ist ersichtlich, daß mit dem entwickelten Patch-clamp-Elektrodenhalter eine effektive interne Perfusion möglich ist. Die Pumpenstromamplitude in Na-freier interner Lösung ist bis an die Auflösungsgrenze der Meßmethode reduziert, obwohl ein steiler einwärtsgerichteter elektrochemischer Gradient für Natriumionen über der Zellmembran besteht. Aufgrund des resultierenden passiven Na-Einstromes muß davon ausgegangen werden, daß c'_{Na} von Null verschieden ist. Die Einwärtsverschiebung des Haltestromes während des Anblasens mit DHO-haltiger externer Lösung ist weder ein mechanischer Artefakt, noch ist ein solcher meßbar daran beteiligt (vergl. Abb. 27).

4.3.2 - von der intrazellulären Mg-Konzentration

Magnesiumionen werden für eine Vielzahl biochemischer Reaktionen benötigt, insbesondere für Reaktionen mit Phosphatverbindungen (vergl. De Weer 1976). Auch die Na/K-ATPase erfordert für ihre Aktivität Mg^{++} (Skou 1957, 1960, Dunham & Glynn 1961). Die Aktivität aufgereinigter Na/K-ATPase zeigt in Abhängigkeit von der Magnesiumkonzentration ein Aktivitätsoptimum (Skou 1957). Auch De Weer (1970) fand bei hohen intrazellulären Mg-Konzentrationen eine Hemmung des aktiven Na-Transportes in Riesenaxonen des Tintenfisches. Bodemann und Hoffman (1976) berichteten von einer direkten Beeinflussung der Konformationszustände der Na/K-Pumpe durch Mg^{++} in Membranen roter Blutkörperchen. In intakten roten Blutkörperchen fanden Flatman und Lew (1977) 3 Hauptpuffersysteme für Mg^{++} , welche unter physiologischen Bedingungen nahezu 90 % des gesamten intrazellulären Magnesiums binden. Hegyvary und Post (1971) stellten fest,

daß ATP auch in der Abwesenheit von Mg^{++} an die Na/K-ATPase bindet. Der MgATP-Komplex wird aber als das eigentliche Substrat betrachtet (Wallick et al. 1973). Das Enzym hat zwei apparente $K_{0.5}$ -Werte für den MgATP-Komplex, 0,5 mM und 1 μ M. Die Bindungsstelle mit der hohen Affinität ($K_{0.5} = 1 \mu$ M) hat vermutlich einen aktivierenden Effekt im Pumpenzyklus. Die Wirkung des Magnesiums kann auch durch andere zweiwertige Kationen wie Mn und Co erzielt werden (Bonting 1970). Andererseits hemmen aber zweiwertige Kationen wie Ca und Ba die Hydrolyse von ATP (Dahl & Hokin 1974). Das Ausmaß der ATP-induzierten Na-Bindung wird durch Magnesium in einem Konzentrationsbereich von 0,25-1,0 mM verstärkt (Vilsen et al. 1987). Da die Autoren komplexiertes ATP verwendeten, schließen sie daraus, daß das aktivierende Mg^{++} direkt an das Enzym bindet. Bei Konzentrationen ≥ 1 mM Mg^{++} wurde eine Hemmung der Na-Bindung festgestellt.

Eine große Schwierigkeit bei Experimenten mit Variation von Ca^{++} besteht darin, die intrazelluläre freie Mg-Konzentration zu bestimmen (vergl. Bodemann & Hoffman 1976). Die Stabilitätskonstanten (reziproke Dissoziationkonstante) für Mg-Komplexbildner werden in physiologischen Systemen durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst und sind deshalb schwer zu bestimmen. EGTA ist als Komplexbildner für Mg^{++} in physiologischen Lösungen nicht geeignet, da EGTA besser das konkurrierende zweiwertige Kation Ca bindet. Die Stabilität der Komplexe aus Ca, Mg, EGTA und ATP ist bei einem pH von 7,4 folgendermaßen verteilt: $CaEGTA > MgATP \approx CaATP > MgEGTA$ (Wallick et al. 1973). Deshalb wurde in den betreffenden Versuchen ein Teil des EGTA durch EDTA ersetzt. Die Stabilität der Komplexe aus Ca, Mg, EDTA und ATP steht bei pH 7,4 in der Beziehung $CaEDTA > MgEDTA > MgATP \approx CaATP$ zueinander (Wallick et al. 1973). Da die Verwendung von EGTA- und EDTA-Konzentrationen > 1 mM in den hier beschriebenen Versuchen nicht zu einer deutlichen Hemmung der Na/K-ATPase führte wie bei Wallick et al. (1973), wurde der Mg-Komplexbildner CDTA eingesetzt. Klodos und Skou (1977) berichten, daß der MgCDTA-Komplex in wässrigen

Lösungen stabiler ist als der MgEDTA-Komplex. Die Autoren weisen daraufhin, daß nicht durch EDTA oder CDTA gebundenes Magnesium, nicht notwendigerweise freies Mg^{++} ist. Auf das nicht gebundene Magnesium haben andere Chelatoren, wie das ATP, einen Einfluß. Flatman und Lew (1981) sind an intakten roten Blutkörperchen in der Lage durch 2 mM extrazelluläres EDTA und eine Erhöhung der Permeabilität der Zellmembran für Mg^{++} den Gesamtgehalt an Mg^{++} auf ca. 100 μM abzusenken. Die Autoren finden im Gegensatz zu den vorliegenden Experimenten einen $K_{0.5}$ -Wert einer sättigenden Komponente für freies intrazelluläres Mg^{++} im Bereich von 30 bis 45 μM für den Na/K-Austausch und eine Komponente der Pumpenaktivität, welche linear mit der freien Mg-Konzentration oberhalb von 0,1 mM ansteigt. Ein kleiner Teil des Ouabain-hemmbarer Na/K-Austausches von 5 % ist in dem Konzentrationsbereich von 10^{-7} bis $6 \cdot 10^{-3}$ M Mg-unabhängig. Freie Mg-Konzentrationen größer als 0,8 mM führten zu einer Hemmung der Na/K-Pumpe.

Die eigenen Versuche an intakten Herzmuskelzellen aus dem Reizleitungssystem erlauben keine quantitative Aussage zur Abhängigkeit des Pumpenstromes von der intrazellulären Mg-Konzentration. Die extrazelluläre Mg-Konzentration war ohne jeden Einfluß auf die Pumpenstromamplitude und wurde in einigen Versuchen nur auf 0 mM gesetzt, um einen Einstrom extrazellulärer Mg-Ionen zu verhindern. Der in Abb. 18 gezeigte Effekt läßt, ebenso wie der Vergleich der Halbwertszeiten der Pumpenstromabnahme (run-down) eine Mg-Abhängigkeit des aktiven Na-Transportes vermuten. Quantitative Aussagen sind jedoch nicht möglich. Trotz des hohen Gesamtgehaltes von ca. 17 mM Magnesium in intakten Herzzellen (Page & Polimeni 1972, Hess et al. 1982) sollte bei den verwendeten hohen Komplexbildnerkonzentrationen eine deutliche Absenkung der freien Mg_i -Konzentration erfolgen. Außer zu einer nicht ausreichenden Absenkung der freien c'_M , könnte es eventuell zu einer Substitution des Mg-Effektes durch die Wirkung anderer zweiwertiger Kationen gekommen sein. Die außer Mg^{++} verwendeten zweiwertigen Kationen Ca und Ba wirken jedoch hemmend auf die ATP-Hydrolyse (Dahl & Hokin 1974). Eine Konkurrenz zwischen

einströmenden extrazellulären Ba-Ionen und intrazellulären Mg-Ionen bezüglich der Komplexbildner kann nicht ausgeschlossen werden.

4.3.3 - von der extrazellulären K- und Cs-Konzentration

Die Werte für eine halbmaximale Aktivierung der Na/K-Pumpe durch extrazelluläre K-Ionen am multizellulären Purkinjefaden variieren in der Literatur zwischen 1 und 12,5 mM (vergl. Deitmer & Ellis 1978, Gadsby 1980, Falk & Cohen 1984). Am Purkinjefaden des Schafherzens wurden höhere $K_{0,5}$ -Werte bei kinetischen Messungen als bei steady-state-Messungen erhalten (Eisner et al. 1981b, Glitsch et al. 1981). Diese Unterschiede sind wahrscheinlich auf morphologische Besonderheiten (enge extrazelluläre Spalträume) zurückzuführen (Krahn 1986). Derartige Phänomene sollten jedoch nicht an isolierten Einzelzellen auftreten.

Der an isolierten und kultivierten Purkinjezellen gemessene $K_{0,5}$ -Wert von 1,2 mM für extrazelluläres Kalium ist in guter Übereinstimmung mit vergleichbaren Werten, die an isolierten Ventrikelzellen (Nakao & Gadsby 1989) und isolierten Purkinjezellen aus dem Hundeherzen (Cohen et al. 1987) gewonnen wurden. Aus den Versuchen an roten Blutkörperchen (Post et al. 1960, Garrahan & Glynn 1967a) und am Tintenfischriesenaxon (Baker et al. 1969, Rakowski et al. 1989) ist bekannt, daß sich die apparente Affinität der Na/K-Pumpe für K_o erhöht, wenn c°_{Na} reduziert wird. Nakao und Gadsby (1989) berichten von einer Beeinflussung des $K_{0,5}$ -Wertes für K_o durch die extrazelluläre Na-Konzentration an isolierten Ventrikelzellen. Ihre Meßwerte von 1,5 mM K_o bei 150 mM c°_{Na} und 0,2 mM in Na-freier externer Lösung sind zu vergleichen mit dem vorliegenden $K_{0,5}$ -Wert von 1,2 mM K_o bei 100 mM c°_{Na} . Die $K_{0,5}$ -Werte für K_o in Hunde-Purkinjefasern mit weiten extrazellulären Spalträumen (Gadsby 1980, Falk & Cohen 1984) sind in der gleichen Größenordnung wie die steady-state-Meßwerte in Purkinjezellen aus Schafherzen (Eisner & Lederer 1981b, Glitsch et al. 1981, Krahn 1986).

In dem untersuchten Potentialbereich führt die Variation von c^o_K in der Gegenwart von Barium nur zu einer Änderung der Na/K-Pumpenaktivität und nicht zu Änderungen anderer Membranstromkomponenten (vergl. Abb. 19; Glitsch & Krahn 1986, Gadsby & Nakao 1989). Auch die Variation von c^o_{Cs} führt bei einem Haltepotential von -20 mV nur zu einer Amplitudenänderung des DHO-hemmbareren Auswärtsstromes (vergl. Abb. 17).

Der $K_{0,5}$ -Wert für c^o_{Cs} von 3,2 mM ist deutlich größer als der $K_{0,5}$ -Wert für K_0 . Er liegt wie bei Eisner und Lederer (1980a) im Bereich des zwei- bis dreifachen Wertes für K_0 . Der $K_{0,5}$ -Wert dieser Autoren von 14,2 mM für Cs₀ scheint jedoch ebenso wie der Wert von 6-7 mM für K_0 durch die Anwendung kinetischer Meßmethoden und den daraus resultierenden Fehlbestimmungen durch Verarmung in den extrazellulären Spalträumen bedingt zu sein. Dieselben Autoren beschreiben auch einen geringeren maximalen Pumpenstrom in extrazellulären Lösungen mit Cs⁺ als in K-haltiger Lösung (vergl. Abb. 22). Es ist bei dem Einsatz von Caesium in elektrophysiologischen Experimenten zu beachten, daß Cs⁺ die Na/K-Pumpe schwächer als K⁺ aktiviert.

Die Hill-Koeffizienten von 1,94 für K_0 und 1,73 für Cs₀ sind mit der Annahme zu vereinbaren, daß zwei externe K- oder Cs-Ionen pro Pumpenzyklus transportiert werden. Nakao und Gadsby (1989) bestimmten n_H -Werte für Kalium um 1 an isolierten Ventrikelzellen. An isolierter Na/K-ATPase aus dem Gehirn und der Niere der Ratte wurde jeweils ein Hill-Koeffizient von 1,5 gemessen (Sweadner 1985). Aufgrund der 3 Na⁺ : 2 K⁺ Stöchiometrie der Na/K-Pumpe werden n_H -Werte zwischen 1 und 2 erwartet.

Eine korrekte Bestimmung der $K_{0,5}$ -Werte setzt voraus, daß bei Anblasen der Zellen mit einer externen Lösung, die 10 mM K⁺ oder 20 mM Cs⁺ enthält, alle Na/K-Pumpenmoleküle der Zellmembran maximal aktiviert werden. Im Idealfall sollte der aktive Na-Transport durch Anblasen der Zellen mit einer

Lösung ohne Aktivatoraktion in einer Cs-haltigen Badlösung vollständig gehemmt werden. Eine Durchmischung der externen Lösungen ist jedoch wahrscheinlich. Um eine quantitative Bestimmung der tatsächlichen mittleren Cs-Konzentrationen an der Zellmembran vornehmen zu können, wurde in dem nahezu linearen Teil der Aktivierungskurve für Cs_o (Abb. 20, < 5 mM) gearbeitet. Aus dem verbleibenden DHO-sensitiven Strom während des Anblasvorganges wurde die tatsächliche Cs-Konzentration bei der Anwendung Aktivatoraktionen-freier Anblaslösung berechnet. Die Berechnung ergibt, daß ca. 70 Vol.% der Pipettenlösung mit 30 Vol.% der Badlösung durchmischt werden. Diese Tatsache kann bei der Bestimmung relativer I_p -Werte (Abb. 20) bei niedrigen Konzentrationen eines Aktivatoraktions zu einer Überschätzung um wenige Prozent geführt haben.

4.4 Die Spannungsabhängigkeit des aktiven Na-Transportes

Da die Na/K-Pumpe elektrogen arbeitet, sollte aus thermodynamischen und kinetischen Gründen das Membranpotential einen Einfluß auf die Pumpenaktivität haben (vergl. De Weer et al. 1988). Der Pumpenzyklus besteht aus einer Reihe von Schritten, welche in dem Albers-Post Schema (Abb. 2) zusammengefaßt werden. Während eines Gegentransportes, von 3 Na⁺ aus der Zelle und 2 K⁺ in die Zelle hinein, nimmt die Na/K-ATPase reversibel zwei verschiedene Konformationen an (E_1 und E_2). Die Form der I_p -V-Beziehung ist interessant, weil sie eine Aussage über die Anzahl spannungsabhängiger Teilreaktionen des Ionentransportes durch die Na/K-Pumpe erlaubt (vergl. Chapman 1984, De Weer 1984). Außerdem ist es von Interesse zu wissen, ob I_p in dem untersuchten Potentialbereich konstant ist, da I_p einen Beitrag zum Ruhepotential leistet, einen Einfluß auf die Aktionspotential-konfiguration hat und eine Wirkung auf die Spontanaktivität. An multizellulären Präparaten aus dem Warmblüterherzen haben frühere Untersuchungen (Isenberg & Trautwein 1974, Eisner & Lederer 1980a, Glitsch et al. 1982, Gadsby 1984) keine oder nur eine geringe Spannungsabhängigkeit von I_p bei Membranpotentialen

zwischen -5 und -90 mV gezeigt. Eine Abnahme der Pumpenstromdichte bei negativeren Haltepotentialen wurde gelegentlich festgestellt (vergl. Glitsch & Krahn 1986). Diese Messungen wurden durch Membranströme, die I_p überlagerten, erschwert. In Untersuchungen, in denen eine Spannungsabhängigkeit von I_p beschrieben wurde (vergl. Marmor 1971, Thomas 1972, Hasuo & Koketsu 1985), wurden andere Erklärungsmöglichkeiten, wie eine Änderung der extrazellulären K-Konzentration in Membrannähe bei Variation des Membranpotentials oder der intrazellulären Na-Konzentration, nicht ausreichend berücksichtigt.

In der Erforschung der Spannungsabhängigkeit des aktiven Na-Transportes wurden in den letzten Jahren zunehmend Einzelzellen und auch rekonstituierte Membranen verwendet (vergl. De Weer et al. 1988). Als Einzelzellen wurden rote Blutkörperchen (Milanick & Hoffman 1986), Oocyten und eine Anzahl isolierter Herzzellen eingesetzt. Auch das Riesenaxon des Tintenfisches ist ein aktuelles Untersuchungsobjekt (Rakowski et al. 1989). Bei den Herzeinzelnzellen kann zwischen Untersuchungen an Zellen des Arbeitsmyokards und des Reizleitungsgewebes unterschieden werden. Isolierte Herzzellen des Arbeitsmyokards wurden in den Experimenten von Gadsby und Mitarbeitern (1985a, b), Stimers und Mitarbeitern (1986), Mehrke und Mitarbeitern (1987), Gadsby und Nakao (1987, 1989) sowie Nakao und Gadsby (1989) verwendet. Unsere Arbeitsgruppe ist zur Zeit die einzige, welche die Spannungsabhängigkeit der Na/K-ATPase an isolierten und kultivierten Einzelzellen aus dem Reizleitungsgewebe des Warmblüterherzens untersucht (siehe Anhang zum Literaturverzeichnis).

Die vorliegenden Experimente zeigen in allen Fällen eine Spannungsabhängigkeit des aktiven Na-Transportes. Auch bei hohen intrazellulären Na-Konzentrationen (> 10 mM) ist eine Spannungsabhängigkeit feststellbar (vergl. Abb. 29). Eine Verringerung von c^i_{Na} auf 5 mM senkt in dem untersuchten Potentialbereich nicht nur die absolute Pumpenstromamplitude, sondern verstärkt auch die Spannungsabhängigkeit. In isolierten Ventrikelzellen des

Meerschweinchens besteht bei hohen c'_{Na} eine deutlichere Spannungsabhängigkeit von I_p , die auch bei einer Senkung von c'_{Na} erhalten bleibt (Gadsby & Nakao 1987, 1989, Nakao & Gadsby 1989). In Oocyten ist dagegen die Spannungsabhängigkeit von I_p in Zellen mit hoher c'_{Na} größer als in Zellen mit niedriger c'_{Na} (Lafaire & Schwarz 1986, Eisner et al. 1987). Der Arbeit von Goldshlegger et al. (1987) an Phospholipidvesikeln mit rekonstituierter Na/K-ATPase aus der Schweineniere ist zu entnehmen, daß die Spannungsabhängigkeit des aktiven Na-Transportes mit einer Senkung der cytoplasmatischen Na-Konzentration verstärkt wird. Die Autoren erklären dieses Verhalten mit einer Wirkung des Membranpotentials auf die Affinität der intrazellulären Na-Bindungsstelle der Na/K-ATPase.

In den I_p -V-Beziehungen der vorliegenden Arbeit wird eine geringe Spannungsabhängigkeit von I_p im Potentialbereich von +20 bis -20 mV gezeigt (Abb. 29 und 30). Eine Abnahme der Pumpenstromamplitude bei positiveren Potentialwerten (bis zu +35 mV) konnte nicht festgestellt werden. Negativ von -20 mV ist je nach Konzentration der intra- bzw. extrazellulären Aktivatorationen ein leichter bis stärkerer Abfall der Pumpenstromamplitude in Richtung negativerer Membranpotentiale zu erkennen. Das beschriebene Potentialverhalten des Pumpenstromes deutet ebenso wie die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen (an Herzzellen: Gadsby & Nakao 1987, 1989, Nakao & Gadsby 1986, 1989, an Oozyten: Eisner et al. 1987, Rakowski & Paxson 1988, am Tintenfischriesenaxon: Rakowski et al. 1989), trotz bestehender Unterschiede in Einzelheiten, auf einen einzigsten potentialabhängigen Schritt im Reaktionszyklus der Na/K-ATPase hin (vergl. Hansen et al. 1981, Chapman 1984, De Weer 1984, Reynolds et al. 1985, De Weer et al. 1988). Lediglich die in der Arbeitsgruppe von Schwarz und Mitarbeitern (Lafaire & Schwarz 1986, Schweigert et al. 1988) gemessene Potentialabhängigkeit von I_p an Oozyten deutet auf einen zweiten potentialabhängigen Schritt, da es hier bei positiven Potentialen zu einer Abnahme der Pumpenstromamplitude kommt. Die Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Meßwerten von Rakowski und Paxson (1988)

an dem gleichen Präparat. Eine Erklärung für die unterschiedlichen Befunde kann zur Zeit nicht gegeben werden. Die Bereiche negativer Steigung in den I_P -V-Beziehungen rückwärts laufender Na/K-Pumpen am Tintenfischriesenaxon (De Weer & Rakowski 1984) konnten in neueren Untersuchungen (Rakowski et al. 1988, 1989) nicht mehr nachgewiesen werden. Mit einer verbesserten Spannungsklemme und dem Einsatz von K^+ -Kanalblockern wurde ein monotoner Anstieg der Pumpenstromamplitude bei Hyperpolarisation der Membran festgestellt (Rakowski et al. 1988). Die Daten von Versuchen an isolierter Na/K-ATPase und von Rekonstitutionsexperimenten (Rephaeli et al. 1986a, b, Apell et al. 1987, Goldshlegger et al. 1987, Jørgensen & Andersen 1988) unterstützen die Hypothese eines einzigsten potentialabhängigen Schrittes im Na/K-Pumpenzyklus und zwar beim Übergang von $E_1(Na^+)_3P$ nach E_2P3Na^+ (Abb.2). Jørgensen und Andersen (1988) unterteilen die sogenannte Deocclusion des Natriums in einen spannungsabhängigen und einen spannungsunabhängigen Schritt. Aufgrund ihrer Experimente ist die Dissoziation des ersten Na-Ions $E_1(Na^+)_3P$ nach $E_2(Na^+)_2P$ die spannungsabhängige Teilreaktion im Na/K-Pumpenzyklus. Die Experimente von Karlisch und Mitarbeitern (Rephaeli et al. 1986a, Goldshlegger et al. 1987) zeigen keine Spannungsabhängigkeit der Teilreaktionen zwischen E_1ATP2K^+ und $E_2(K^+)_2$ und keine Spannungsabhängigkeit des Pumpenstromes unter Bedingungen, in denen die K-Translokation geschwindigkeitsbestimmend ist. Auch an isolierten Ventrikelzellen des Meerschweinchens fanden Bahinski und Mitarbeiter (1988) keine spannungsabhängige Teilreaktion in der Kaliumtranslokation.

Die Versuche mit unterschiedlichen chemischen Gradienten für das extrazelluläre Aktivator-Kation Cs (Abb. 30) ergaben, daß nicht nur die intrazelluläre Na-Konzentration einen Einfluß auf die Spannungsabhängigkeit des Pumpenstromes hat. Die Gleichungen 1 und 2 geben eine quantitative Beschreibung des Umsatzes der freien Energie aus der ATP-Hydrolyse in die elektrische und chemische Arbeit der Na/K-Pumpe. Mit einer Erhöhung des chemischen Gradienten, gegen den die Na/K-Pumpe transportiert, steht

bei konstanter freier Energie aus der ATP-Spaltung weniger Energie für die elektrische Arbeit zur Verfügung. Die in Abb. 30 gezeigten normierten I_F -V-Beziehungen unterstützen die Hypothese, daß eine Erhöhung des chemischen Gradienten, gegen welchen die Kationen transportiert werden müssen, zu einer Versteilerung der Spannungsabhängigkeit von I_F führt. Setzt man die verwendeten Ionenkonzentrationen in Gleichung 1 ein, so erhält man bei 40 mM c^o_{Cs} ein um ca. 100 mV negativeres Umkehrpotential als bei 6 mM c^o_{Cs} . Eine Linksverschiebung der I_F -V-Beziehung um 100 mV in 40 mM c^o_{Cs} würde zu einem Verschwinden der in 6 mM c^o_{Cs} deutlichen Spannungsabhängigkeit führen. Die Beobachtung, daß eine Senkung von c^o_{Na} bei konstanter c^i_{Na} die I_F -V-Beziehung in isolierten Herzzellen abflacht, d.h. die Spannungsabhängigkeit wird reduziert (Gadsby & Nakao 1987, Nakao & Gadsby 1989), stimmt mit der oben genannten Hypothese ebenso überein. Die dargestellte Hypothese ist nur eine Erklärungsmöglichkeit. Eventuell sind die Bedingungen bei 40 mM c^o_{Cs} auch so gewählt, daß eine spannungsunabhängige Teilreaktion umsatzlimitierend wirkt.

Für die hemmende Wirkung einer Hyperpolarisation auf den elektrogenen Na-Transport gibt es generell zwei Erklärungsmöglichkeiten. Außer einer Hemmung der Vorwärtsreaktion kann es auch zu einer Aktivierung der Rückwärtsreaktion kommen (Rakowski et al. 1988). Die Befunde von Rakowski et al. (1989) sprechen für eine Hemmung der Vorwärtsreaktion.

4.5 Die Abnahme der Pumpenstromamplitude in Abhängigkeit von der Versuchsdauer

In einem großen Teil der Experimente kommt es zu einer Abnahme der Pumpenstromamplitude mit fortschreitender Versuchsdauer (vergl. Abb. 18). Aber es gibt auch Versuche, in denen die Pumpenstromamplitude über mehr als 60 Minuten konstant ist (vergl. Abb. 16).

Die Verringerung von I_F kann auf einer langsamen Absenkung eines Cofaktors für die Pumpenaktivität beruhen (Abb. 18).

Ein unterschiedlich starker run-down von I_p tritt aber auch bei optimalen Konzentrationen von ATP, Kreatinphosphat, Mg- und Na-Ionen auf der cytoplasmatischen Seite der Zellmembran auf. Gadsby und Nakao (1989) beschreiben an isolierten Ventrikelzellen einen vergleichbaren run-down, der wahrscheinlich nicht auf eine mangelnde Versorgung der Na/K-Pumpe mit Substrat zurückzuführen ist. Auch der Einsatz von Proteasehemmern in der internen Lösung führt an diesen Zellen nicht zu einer Aufhebung des run-down. Die Autoren vermuten unter anderem einen beschleunigten Abtransport von Pumpenmolekülen aus der Zellmembran durch Endozytose. Die Form der I_p -V-Beziehungen wird durch die Reduzierung der maximalen Pumpenstromamplitude jedenfalls nicht beeinflusst.

Ein Vergleich der Zeitkonstanten für die Erhöhung der intrazellulären Na-Konzentration mittels interner Perfusion mit der Zeitkonstanten für den run-down führte zu der Hypothese, daß eventuell eine intrazelluläre Komponente, die für die Integrität der Na/K-Pumpen notwendig ist, ausgewaschen wird (Gadsby & Nakao 1989) und somit den run-down verursacht. Diese Komponente ist entweder ein besonders großes Molekül oder der niedrige apparente Diffusionskoeffizient wird durch eine intrazelluläre Bindung vorgetäuscht.

Häufig ist ein steilerer Abfall der Pumpenstromamplitude zu Beginn des Experimentes zu beobachten (vergl. Gadsby & Nakao 1989). Die Pumpenstromamplitude ist im Bereich des halben initialen Wertes meist über einen längeren Zeitraum konstant. Eine Abnahme von I_p auf den Null-Wert in intra- und extrazellulären Lösungen mit Aktivatoraktionen sowie intrazellulärem ATP und Kreatinphosphat konnte an intakten Einzelzellen nicht gemessen werden.

4.6 Ist I_p ein zuverlässiges Maß für die Na/K-Pumpenaktivität?

Da der DHO-sensitive Strom als Maß für die Aktivität der Na/K-Pumpe genommen wird, müssen folgende Bedingungen erfüllt werden:

Der Kopplungsfaktor der Na/K-Pumpe von $3 \text{ Na}^+ : 2 \text{ K}^+$ pro gespaltenem ATP-Molekül darf durch die vorgenommenen Änderungen der Kationenkonzentrationen nicht verändert werden.

Der Kopplungsfaktor der Na/K-Pumpe muß potentialunabhängig sein.

Der spezifische Hemmstoff DHO der Na/K-ATPase darf in den verwendeten Konzentrationen keine andere Wirkung haben, als die Blockierung des aktiven Na-Transportes.

Die Wirkung von DHO muß über den gesamten untersuchten Potentialbereich gewährleistet sein.

Beim Anblasen von Lösungen ist ein Durchmischen der Anblaslösung mit der Badlösung zu berücksichtigen.

Nach dem Etablieren einer Ganzzellableitung ist ein Zeitraum abzuwarten, in welchem die cytoplasmatischen Konzentrationen den Konzentrationen der internen Lösung angeglichen werden.

In der Spannungsklemme müssen alle Membranbereiche auf das gleiche Potential geklemmt werden.

Die Konstanz des Kopplungsfaktors der Na/K-ATPase bei Konzentrationänderungen der Aktivatorkationen wurde bereits diskutiert. Einen konstanten Kopplungsfaktor bei Variation des Haltepotentials fanden Rakowski und Mitarbeiter (1989) am Riesenaxon des Tintenfisches bei hoher und niedriger C°_{Na} .

DHO hat keinen direkten Einfluß auf passive Membranpermeabilitäten (Abb. 27) (vergl. Schweigert et al. 1988). Die Bindung von DHO an die inhibitorische Stelle der Na/K-ATPase ist spannungsunabhängig (Schwarz & Lafaïre 1986, Lafaïre et al. 1988, vergl. auch Gadsby & Nakao 1989).

Beim Anblasen findet im Mittel eine Durchmischung von 70 Vol.% der Anblaslösung mit 30 Vol.% der Badlösung statt. Nimmt man eine sehr ungünstige Lösungsverteilung von 1 : 1

bei der niedrigsten verwendeten DHO-Konzentration von $2 \cdot 10^{-4}$ M an, so ergibt sich immer noch eine effektive DHO-Konzentration von $1 \cdot 10^{-4}$ M. Diese Konzentration ist auch bei hohen extrazellulären K-Konzentrationen noch maximal hemmend (vergl. Krahn 1986, Cohen et al. 1987, Schweigert et al. 1988).

Obwohl es sich um steady-state-Messungen handelt, bestehen vermutlich kleine Konzentrationsunterschiede in Membrannähe gegenüber den vorgegebenen Lösungen. Bei starker Aktivierung der Na/K-Pumpe kann es auf der intrazellulären Seite zu einer Absenkung der Na- und ATP-Konzentration in Membrannähe, aufgrund der limitierten Diffusion zwischen der Patch-clamp-Elektrode und dem Zellinneren, kommen. Auf der extrazellulären Seite ist unter gleichen Bedingungen eine K-Verarmung zu vermuten. Bei Anwendung von sehr niedrigen Konzentrationen eines Aktivators (z.B. $c^i_{Na} = 0$ mM oder c^o_K bzw. $c^o_{Cs} = 0$ mM), und den daraus resultierenden großen Ionengradienten, können passive Ströme zu einer Erhöhung der niedrigen Konzentrationen führen. Die Bedeutung dieser Phänomene für die vorliegenden Messungen ist nach Abb. 13 und 27 gering. Bei einer Abschätzung der Fehlergröße ist zu berücksichtigen, daß die Patch-clamp-Elektrode ein mehrmillionenfaches Volumen gegenüber der Einzelzelle hat und die untersuchten Ionen sehr gut diffundieren. Auf der extrazellulären Seite sollten die beschriebenen Phänomene noch geringer sein, da sich die Zellen in einem ständig fließenden Lösungsstrom befinden (vergl. Nakao & Gadsby 1989).

Die Wirkungen der möglichen Fehlerquellen auf die erhaltenen Meßwerte kann nicht quantitativ bestimmt werden. Bei hohen Konzentrationen der Aktivatorarten wird der maximale Pumpenstrom möglicherweise unterschätzt und bei geringen Konzentrationen wahrscheinlich überschätzt. Beide Phänomene führen zu einer Überschätzung der $K_{0.5}$ -Werte (vergl. Nakao & Gadsby 1989). Deshalb werden die $K_{0.5}$ -Werte von 9 mM für c^i_{Na} , 1,2 mM für c^o_K und 3,2 mM für c^o_{Cs} als Maximalwerte betrachtet.

V. Zusammenfassung

Die Na/K-Pumpe des Herzens erzeugt einen elektrischen Strom (I_p). Dieser Strom beeinflusst das Ruhepotential, das Aktionspotential und die Spontanaktivität von Herzzellen. Die vorliegende Arbeit hat das Ziel, I_p als Funktion intra- und extrazellulärer Kationenkonzentrationen und des Membranpotentials zu untersuchen.

Aus Purkinjefasern adulter Warmblüterherzen werden mit Hilfe verschiedener Enzyme Einzelzellen isoliert. Die entwickelte Methode zur Isolierung von Purkinjenzellen ergibt einen hohen Prozentsatz (durchschnittlich 50 %) intakter Einzelzellen. Die frischisolierten Purkinjenzellen können kultiviert werden. Sie nehmen in Kultur für 10-14 Tage eine kugelförmige Gestalt an (Cardioball).

Die abgerundeten Einzelzellen sind für elektro-physiologische Untersuchungen mit der Patch-clamp-Technik (Ganzzellableitung) geeignet. Durch einen neukonstruierten Elektrodenhalter für die interne Perfusion der Zellen werden Untersuchungen mit verschiedenen intrazellulären Lösungen an derselben Einzelzelle möglich.

Die Erhöhung der intrazellulären Na-Konzentration aktiviert einen Auswärtsstrom, der durch Herzglykoside gehemmt werden kann. Der Herzglykosid-sensitive Strom wird als I_p betrachtet. Der elektrogene Na-Transport ist in Form einer Sättigungskinetik von der intrazellulären Na-Konzentration abhängig. Der $K_{0.5}$ -Wert von 9 mM für c_{Na}^i liegt im Bereich der physiologischen Na_i -Konzentration von Herzzellen.

In Mg-freier Bad- und Elektrodenlösung ist bei gleichzeitiger Anwendung hoher intrazellulärer Konzentrationen (2 mM) eines Mg-Komplexbildners keine vollständige Hemmung des aktiven Na-Transportes zu erreichen. Die Ergebnisse unterstützen die Hypothese, daß Änderungen der Mg-Konzentration im physiologischen Bereich keinen Einfluß auf den Pumpenstrom haben.

Die Amplitude des Pumpenstromes ist eine S-förmige Funktion der extrazellulären K^+ oder Cs -Konzentration. Eine halbmaximale Aktivierung von I_p erfolgt bei 1,2 mM K^+ oder 3,2 mM Cs . (Haltepotential: -20 mV). Die Hill-Koeffizienten von 1,94 für K^+ und 1,73 für Cs sind mit der Annahme zu vereinbaren, daß zwei externe Aktivatorreaktionen pro Pumpenzyklus transportiert werden. Im Vergleich zum Kalium können hohe extrazelluläre Cs -Konzentrationen (20 mM) nicht dieselbe maximale I_p -Dichte erzeugen.

Die Spannungsabhängigkeit von I_p ist zwischen -20 und +20 mV gering und nimmt mit negativeren Membranpotentialen zu. Die I_p -V-Beziehung wird mit einer Abnahme von c^i_{Na} (Erhöhung des transmembranären Na-Gradienten) steiler. In Gegenwart von 10 mM Na_i beträgt die I_p -Amplitude bei -100 mV 68 % des Wertes bei +20 mV. Ein vergleichbarer Effekt auf die Spannungsabhängigkeit von I_p wird festgestellt bei Erhöhung des Cs -Gradienten über der Zellmembran durch Abnahme der extrazellulären Cs -Konzentration.

Die registrierten Pumpenstrom-Spannungs-Beziehungen zeigen, daß I_p in elektrisch aktiven Herzzellen variiert. Die Sättigungscharakteristik deutet auf eine einzige potentialabhängige Teilreaktion im Pumpenzyklus.

Va. Summary

The cardiac Na/K-pump generates an electric current (I_p). This current influences the membrane potential, the action potential and the spontaneous activity of heart cells. The present paper aims at examining I_p as a function of intra- and extracellular cation concentrations and membrane potential.

Utilizing various enzymes single cells are isolated from Purkinje fibres of adult warm blooded animals. The method developed to isolate Purkinje cells delivers a high percentage (on an average 50 %) of intact single cells. The freshly isolated Purkinje cells can be cultered. For 10-14 days in culture they retain a spherical form (cardioball).

The rounded off single cells are suitable for electrophysiological examinations with the patch-clamp technique (whole-cell recording). A novel electrode holder for internal perfusion allows examinations of an identical single cell with different intracellular solutions.

The increase of intracellular Na-concentration activates an outward current, which can be inhibited by cardiac glycosides. The cardiac glycoside sensitive current is regarded as I_p . The electrogenic Na-transport depends on the intracellular Na-concentration obeying saturation kinetics. The $K_{0.5}$ -value of 9 mM for c'_{Na} is in the range of the physiological Na_i -concentration of cardiac cells.

During simultaneous application of high intracellular Mg-chelator concentrations (2 mM) and Mg-free internal and external solutions a complete inhibition of the active Na-transport can not be reached. The results support the hypothesis that changes of the Mg-concentration within the physiological range exert no influence on the I_p -amplitude.

The amplitude of the pump current is an S-shaped function of the extracellular K- or Cs-concentration. A half-maximal

activation of I_p appears at 1.2 mM K_o or 3.2 mM Cs_o (holding potential -20 mV). The Hill-coefficients of 1.94 for K_o and 1.73 for Cs_o agree with the assumption that two external activator cations are transported per pump cycle. Compared to potassium high external Cs -concentrations (20 mM) are not able to generate the same maximal I_p -density.

The voltage-dependence of I_p is low between -20 and +20 mV and increases with more negative membrane potentials. The I_p -V-relation ascends with a decrease of c'_{Na} (increase of transmembrane Na-gradient). In presence of 10 mM Na_i the I_p -amplitude at -100 mV amounts to 68 % of the value at +20 mV. A comparable effect on the voltage dependence of I_p is observed following an increase of the Cs -gradient across the cell membrane by lowering the external Cs -concentration.

The registered pump current-voltage-relations show that I_p varies in electrical active cardiac cells. The saturation characteristic indicates a single potential dependent reaction step in the pump cycle.

VI. Liste der Abkürzungen

a^i_{Na}	: intrazelluläre Natriumaktivität
ADP	: Adenosindiphosphat
ATP	: Adenosintriphosphat
ATPase	: Adenosintriphosphat-spaltendes Enzym
BNC	: Bajonett-Norm-Connektor
BSA	: Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
c^o_x , c^i_x	: Konzentration (c) der Ionensorte x an der Außen- (o) bzw. Innenseite (i) der Zellmembran
CDTA	: trans-1,2-Diamino-cyclohexan-N,N,N',N'-tetraessigsäure
DHO	: Dihydro-g-strophanthin (dihydroouabain)
E_1 , E_2	: Konformationszustände der Na/K-ATPase
E_K	: Kaliumgleichgewichtspotential
E_{Na}	: Natriumgleichgewichtspotential
E.C.	: (mit nachfolgender Zahlenangabe) Enzym Kommission (enzyme commission), die Zahlen bezeichnen die Klassifizierung der Enzyme, Na/K-ATPase (E.C.3.6.1.3)
EGTA	: Ethylenglykol-bis(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
EDTA	: Ethylendiamin-tetraessigsäure
F	: Faradaykonstante
FCS	: fetales Kälberserum (foetal calf serum)
ΔG_{ATP}	: freie Energie aus der ATP-Hydrolyse
HEPES	: N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
i_i	: innen
I	: Strom
I_M	: Membranstrom
I_{Na}	: schneller Natriumeinstrom
$I_P(max)$	: (maximaler) Pumpenstrom
$K(max)$	: (maximale) Umsatzgeschwindigkeit
$K_{0.5}$	: Wert der halbmaximalen Aktivierung
KrP	: Kreatinphosphat
n	: Anzahl von ausgewerteten Zellen
n'	: Anzahl von Bindungsstellen
n_H	: Hill-Koeffizient

O, o	: außen
p	: Irrtumswahrscheinlichkeit
P _i	: Orthophosphat
r	: Korrelationskoeffizient
R	: allgemeine Gaskonstante
R ₁	: Widerstand im Rückkopplungskreis
R ₂	: Gesamteingangswiderstand
R _{abd}	: Abdichtwiderstand
R _{mem}	: Membranwiderstand der Zelle
R _{pip}	: Pipettenwiderstand
S	: Standardabweichung
[S]	: Substratkonzentration
T	: Temperatur
TEACl	: Tetraethylammoniumchlorid
U _{Aus}	: Ausgangsspannung
U _{klemm}	: Klemmspannung
V	: Spannung
V ₀	: Umkehrpotential des aktiven Transportes
V _c	: Haltepotential
WCR	: Ganzzelleableitung (whole cell recording)
z	: Wertigkeit

VII. Literaturverzeichnis

- Altschuld R, Gibb L, Ansel A, Hohl C, Kruger F A, Brierley G P (1980) Calcium tolerance of isolated rat heart cells. *J Mol Cell Cardiol* 12, 1383-1395
- Apell H-J, Borlinghaus R, Läuger P (1987) Fast charge translocations associated with partial reactions of the Na,K-pump: II. Microscopic analysis of transient currents. *J Mem Biol* 97, 179-191
- Bahinski A, Nakao M, Gadsby D C (1988) Potassium translocation by the Na⁺/K⁺ pump is voltage insensitive. *Proc Natl Acad Sci* 85, 3412-3416
- Baker P F, Blaustein M P, Keynes R D, Manil J, Shaw T I, Steinhardt R A (1969) The ouabain-sensitive fluxes of sodium and potassium in squid giant axons. *J Physiol (Lond)* 200, 459-496
- Bechem M, Pott L, Rennebaum H (1983) Atrial muscle cells from hearts of adult guinea-pigs in culture: a new preparation for cardiac cellular electrophysiology. *Eur J Cell Biol* 31, 366-369
- Berry M N, Friend D S, Scheuer J (1970) Morphology and metabolism of intact muscle cells isolated from adult rat heart. *Circ Res* 26, 679-687
- Bodemann H H, Hoffman J F (1976) Effects of Mg and Ca on the side dependencies of Na and K on ouabain binding to red blood cell ghosts and the control of Na transport by internal Mg. *J Gen Physiol* 67, 547-561
- Bonting S L (1970) Sodium-potassium activated adenosine-triphosphatase and cation transport. In: Bittar E E (ed) *Membranes and ion transport*, Vol 1, 257-363. Wiley Interscience, London

- Bosteels S, Carmeliet E (1972) The components of sodium efflux in cardiac Purkinje fibres. *Pflügers Arch* 336, 48-59
- Brinley F J Jr., Mullins L J (1970) The effect of membrane potential and internal potassium ions on sodium efflux from dialyzed squid giant axons. *Biophys J* 10, 9a
- Brown A M, Lee K S, Powell T (1981a) Voltage clamp and internal perfusion of single rat heart muscle cells. *J Physiol (Lond)* 318, 455-477
- Brown A M, Lee K S, Powell T (1981b) Sodium current in single rat heart muscle cells. *J Physiol (Lond)* 318, 479-500
- Callewaert G, Carmeliet E, Vereecke J (1984) Single cardiac Purkinje cells: general electrophysiology and voltage-clamp analysis of the pace-maker current. *J Physiol (Lond)* 349, 643-661
- Canale E, Campbell J H, Campbell G R (1983) Cardiac Purkinje cells in culture. *J Mol Cell Cardiol* 15, 197-206
- Cantley L C (1981) Structure and mechanism of the (Na,K)-ATPase. *Current Topics in Bioenergetics* 11, 201-237
- Cavanaugh M (1955) Pulsation, migration and division in dissociated chick embryo heart cells in vitro. *J Exp Zool* 128, 573-585
- Chapman J B (1984) Thermodynamics and kinetics of electrogenic pumps. In: Blaustein M P, Lieberman M (eds) *Electrogenic transport: fundamental principles and physiological implications*, 17-32. Raven Press, New York
- Chapman J B, Johnson E A (1978) The reversal potential for an electrogenic sodium pump: A method for determining

the free energy of ATP breakdown? *J Gen Physiol* 72, 403-408

Chapman J B, Johnson E A, Kootsey I M (1983) Electrical and biochemical properties of an enzyme model of the sodium pump. *J Mem Biol* 74, 139-153

Claycomb W C, Palazzo M C (1980) Culture of the terminally differentiated adult cardiac muscle cell: a light and scanning electron microscope study. *Develop Biol* 80, 466-482

Cohen I S, Datyner N B, Gintant G A, Mulrine N K, Pennefather P (1987) Properties of an electrogenic sodium-potassium pump in isolated canine Purkinje myocytes. *J Physiol (Lond)* 383, 251-267

Dahl J L, Hokin L E (1974) The sodium-potassium adenosine-triphosphatase. *Ann Rev Biochem* 43, 327-356

Daut J (1983) Inhibition of the sodium pump in guinea-pig ventricular muscle by dihydro-ouabain: effects of external potassium and sodium. *J Physiol (Lond)* 339, 643-662

Daut J, Rüdel R (1982) The electrogenic sodium pump in guinea-pig ventricular muscle: inhibition of pump current by cardiac glycosides. *J Physiol (Lond)* 330, 243-264

Dean R B (1941) Theories of electrolyte equilibrium in muscles. *Biol Symp* 3, 331-348

Deitmer J W, Ellis D (1978) The intracellular sodium activity of cardiac Purkinje fibres during inhibition and re-activation of the Na-K pump. *J Physiol (Lond)* 284, 241-259

- Délèze J (1960) Possible reasons for drop of resting potential of mammalian heart preparations during hypothermia. *Circ Res* 8, 553-557
- De Weer P (1970) Effects of intracellular adenosine-5'-diphosphate and orthophosphate on the sensitivity of sodium efflux from squid giant axon to external sodium and potassium. *J Gen Physiol* 56, 583-620
- De Weer P (1976) Axoplasmic free magnesium levels and magnesium extrusion from squid giant axons. *J Gen Physiol* 68, 159-178
- De Weer P (1984) Electrogenic pumps: theoretical and practical considerations. In: Blaustein M P, Lieberman M (eds) *Electrogenic transport: fundamental principles and physiological implications*, 1-15. Raven Press, New York
- De Weer P (1985) Cellular sodium-potassium transport. In: Seldin D W, Giebisch G (eds) *The kidney: physiology and pathophysiology*, 31-48. Raven Press, New York
- De Weer P, Rakowski R F (1984) Current generated by backward-running electrogenic Na pump in squid giant axons. *Nature* 309, 450-452
- De Weer P, Gadsby D C, Rakowski R F (1988) Voltage dependence of the Na-K pump. *Ann Rev Physiol* 50, 225-241
- DiFrancesco D, Noma A, Trautwein W (1979) Kinetics and magnitude of the time-dependent potassium current in the rabbit SA node: effect of external potassium. *Pflügers Arch* 381, 271-279
- Dudel J, Rüdel R (1970) Voltage and time dependence of excitatory sodium current in cooled sheep Purkinje fibres. *Pflügers Arch* 315, 136-158

- Dunham E T, Glynn I M (1961) Adenosinetriphosphatase activity and the active movements of alkali metal ions. *J Physiol (Lond)* 156, 274-293
- Eisner D A (1986) The Na-K pump in cardiac muscle. In: Fozzard H A, Haber E, Jennings R B, Katz A M, Morgan H E (eds) *The heart and cardiovascular system*, Vol 1, 489-507. Raven Press, New York
- Eisner D A, Lederer W J (1979) The role of the sodium pump in the effects of potassium-depleted solutions on mammalian cardiac muscle. *J Physiol (Lond)* 294, 279-301
- Eisner D A, Lederer W J (1980a) Characterization of the electrogenic sodium pump in cardiac Purkinje fibres. *J Physiol (Lond)* 303, 441-474
- Eisner D A, Lederer W J (1980b) The relationship between sodium pump activity and twitch tension in cardiac Purkinje fibres. *J Physiol (Lond)* 303, 475-494
- Eisner D A, Lederer W J, Vaughan-Jones R D (1981a) The dependence of sodium pumping and tension on intracellular sodium activity in voltage-clamped sheep Purkinje fibres. *J Physiol (Lond)* 317, 163-187
- Eisner D A, Lederer W J, Vaughan-Jones R D (1981b) The effects of rubidium ions and membrane potential on the intracellular sodium activity of sheep Purkinje fibres. *J Physiol (Lond)* 317, 189-205
- Eisner D A, Lederer W J, Vaughan-Jones R D (1984) The electrogenic Na pump in mammalian cardiac muscle. In: Blaustein M P, Lieberman M (eds) *Electrogenic transport: fundamental principles and physiological implications*, 193-213. Raven Press, New York
- Eisner D A, Valdeolmillos M, Wray S (1987) The effects of membrane potential on active and passive sodium

transport in *Xenopus* oocytes. *J Physiol (Lond)* 385, 643-659

Erecinska M, Wilson D F (1978) Homeostatic regulation of cellular energy metabolism. *TIBS* 3, 219-222

Falk R T, Cohen I S (1984) Membrane current following activity in canine cardiac Purkinje fibers. *J Gen Physiol* 83, 771-799

Flatman P, Lew V L (1977) Use of ionophore A23187 to measure and control free and bound cytoplasmic Mg in intact red cells. *Nature* 267, 360-362

Flatman P W, Lew V L (1981) The magnesium dependence of sodium-pump-mediated sodium-potassium and sodium-sodium exchange in intact human red cells. *J Physiol (Lond)* 315, 421-446

Gadsby D C (1980) Activation of electrogenic Na^+/K^+ exchange by extracellular K^+ in canine cardiac Purkinje fibers. *Proc Natl Acad Sci* 77, 4035-4039

Gadsby D C (1984) The Na/K pump of cardiac cells. *Ann Rev Biophys Bioeng* 13, 373-398

Gadsby D C, Cranefield P F (1979) Electrogenic sodium extrusion in cardiac Purkinje fibers. *J Gen Physiol* 73, 819-837

Gadsby D C, Nakao M (1986) Dependence of Na/K pump current on intracellular [Na] in isolated cells from guinea-pig ventricle. *J Physiol (Lond)* 371, 201P

Gadsby D C, Nakao M (1987) [Na] dependence of the Na/K pump current-voltage relationship in isolated cells from guinea-pig ventricle. *J Physiol (Lond)* 382, 105P

- Gadsby D C, Nakao M (1989) Steady-state current-voltage relationship of the Na/K-pump in guinea-pig ventricular myocytes. *J Gen Physiol* (im Druck)
- Gadsby D C, Wit A L (1981) Electrophysiologic characteristics of cardiac cells and the genesis of cardiac arrhythmias. In: Wilkerson D (ed) *Cardiac pharmacology*, 229-274. Academic Press, New York
- Gadsby D C, Kimura J, Noma A (1985a) The isolated Na-K-pump current: effects of changing external K, intracellular Na and ATP in internally dialysed single guinea-pig ventricular cell. *J Physiol (Lond)* 358, 55P
- Gadsby D C, Kimura J, Noma A (1985b) Voltage dependence of Na/K pump current in isolated heart cells. *Nature* 315, 63-65
- Garay R P, Garrahan P J (1973) The interaction of sodium and potassium with the sodium pump in red cells. *J Physiol (Lond)* 231, 297-325
- Cardos G (1954) Akkumulation der Kaliumionen durch menschliche Blutkörperchen. *Acta Physiol Acad Sci Hung* 6, 191-199
- Garrahan P J, Glynn I M (1967a) The behaviour of the sodium pump in red cells in the absence of external potassium. *J Physiol (Lond)* 192, 159-174
- Garrahan P J, Glynn I M (1967b) The stoichiometry of the sodium pump. *J Physiol (Lond)* 192, 217-235
- Glitsch H G (1969) Über das Membranpotential des MeerschweinchenVorhofes nach Hypothermie. *Pflügers Arch* 307, 29-46
- Glitsch H G (1970) Über einige Eigenschaften des aktiven Na⁺-Transports am Myocard. *Dtsch med Wschr* 95, 963-970

- Glitsch H G (1972) Activation of the electrogenic sodium pump in guinea-pig auricles by internal sodium ions. *J Physiol (Lond)* 202, 565-582
- Glitsch H G (1979) Characteristics of active Na transport in intact cardiac cells. *Am J Physiol* 236, H189-199
- Glitsch H G (1982) Electrogenic Na pumping in the heart. *Ann Rev Physiol* 44, 389-400
- Glitsch H G, Krahn T (1986) The cardiac electrogenic Na pump. In: Lüttgau H C (ed) *Membrane control of cellular activity*. *Progr Zool* 33, 401-417. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York
- Glitsch H G, Pusch H (1980) Correlation between changes in membrane potential and intracellular sodium activity during K activated response in sheep Purkinje fibres. *Pflügers Arch* 384, 189-191
- Glitsch H G, Pusch H (1984) On the temperature dependence of the Na pump in sheep Purkinje fibres. *Pflügers Arch* 402, 109-115
- Glitsch H G, Grabowski W, Thielen J (1978) Activation of the electrogenic sodium pump in guinea-pig atria by external potassium ions. *J Physiol (Lond)* 276, 515-524
- Glitsch H G, Kampmann W, Pusch H (1981) Activation of active Na transport in sheep Purkinje fibres by external K or Rb ions. *Pflügers Arch* 391, 28-34
- Glitsch H G, Pusch H, Schumacher Th, Verdonck F (1982) An identification of the K activated Na pump current in sheep Purkinje fibres. *Pflügers Arch* 394, 256-263
- Glynn I M, Karlisch S J D (1975) The sodium pump. *Ann Rev Physiol* 37, 13-55

- Glynn I M, Lew V L (1970) Synthesis of adenosine triphosphate at the expense of downhill cation movements in intact human red cells. *J Physiol (Lond)* 207, 393-402
- Godfraind T, Ghysel-Burton J (1977) Binding sites related to ouabain-induced stimulation or inhibition of the sodium pump. *Nature* 265, 165-166
- Goldshlegger R, Karlisch S J D, Rephaeli A, Stein W D (1987) The effect of membrane potential on the mammalian sodium-potassium pump reconstituted into phospholipid vesicles. *J Physiol (Lond)* 387, 331-355
- Hamill O P, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth F J (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 391, 85-100
- Hansen U-P, Gradmann D, Sanders D, Slayman C L (1981) Interpretation of current-voltage relationships for "active" ion transport systems: I. steady-state reaction-kinetic analysis of class-I mechanisms. *J Mem Biol* 63, 165-190
- Harary I, Farley B (1960) In vitro studies of single isolated beating heart cells. *Science* 131, 1674-1675
- Hasuo H, Koketsu K (1985) Potential dependency of the electrogenic Na⁺-pump current in bullfrog atrial muscles. *Jap J Physiol* 35, 89-100
- Haworth R A, Hunter D R, Berkoff H A (1980) The isolation of Ca²⁺-resistant myocytes from the adult rat. *J Mol Cell Cardiol* 12, 715-723
- Hegyvary C, Post R L (1971) Binding of adenosine triphosphate to sodium and potassium ion-stimulated adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* 246, 5234-5240

- Hess P, Metzger P, Weingart R (1982) Free magnesium in sheep, ferret and frog striated muscle at rest measured with ion-selective micro-electrodes. *J Physiol (Lond)* 333, 173-188
- Hiraoka M, Hecht H H (1973) Recovery from hypothermia in cardiac Purkinje fibers: considerations for an electrogenic mechanism. *Pflügers Arch* 339, 25-36
- Hodgkin A L, Keynes R D (1955) Active transport of cations in giant axons from *Sepia* and *Loligo*. *J Physiol (Lond)* 128, 28-60
- Isenberg G, Klöckner U (1982a) Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by preincubation in a "KB Medium". *Pflügers Arch* 395, 6-18
- Isenberg G, Klöckner U (1982b) Isolated bovine ventricular myocytes: Characterization of the action potential. *Pflügers Arch* 395, 19-29
- Isenberg G, Klöckner U (1982c) Calcium currents of isolated bovine ventricular myocytes are fast and of large amplitude. *Pflügers Arch* 395, 30-41
- Isenberg G, Trautwein W (1974) The effect of dihydro-ouabain and lithium-ions on the outward current in cardiac Purkinje fibers. Evidence for electrogenicity of active transport. *Pflügers Arch* 350, 41-54
- Jørgensen P L (1980) Sodium and potassium ion pump in kidney tubules. *Physiol Rev* 60, 864-917
- Jørgensen P L, Andersen J P (1988) Structural basis for E_1 - E_2 conformational transitions in Na,K-pump and Ca-pump proteins. *J Mem Biol* 103, 95-120
- Kahn J B Jr (1957) The effect of various lactones and related compounds on cation transfer in incubated

- cold-stored human erythrocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 121, 234-251
- Karlish S J D, Stein W D (1985) Cation activation of the pig kidney sodium pump: transmembrane allosteric effects of sodium. *J Physiol (Lond)* 359, 119-149
- Keynes R D (1961) The mechanism of active transport of ions in nerve and muscle fibres. In: *Biochemie des aktiven Transports*, 145-159. Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg
- Klodos I, Skou J C (1977) The effect of chelators on Mg^{2+} , Na^{+} -dependent phosphorylation of $(Na^{+}+K^{+})$ -activated ATPase. *Biochim Biophys Acta* 481, 667-679
- Knight A B, Welt L G (1974) Intracellular potassium: A determinant of the sodium pump rate. *J Gen Physiol* 63, 351-373
- Krahn T (1986) Beitrag des elektrogenen Na-Transportes zum Membranpotential des Schaf-Purkinjefadens. Diplomarbeit an der Abteilung für Biologie der Ruhr-Universität Bochum
- Kono T (1969) Roles of collagenases and other proteolytic enzymes in the dispersal of animal tissues. *Biochim Biophys Acta* 178, 397-400
- Läuger P (1969) Transportphänomene an Membranen. *Angew Chem* 81, 56-68
- Läuger P, Apell H J (1986) A microscopic model for the current-voltage behaviour of the Na,K -pump. *Eur Biophys J* 13, 309-321
- Läuger P, Apell H J (1988) Voltage dependence of partial reactions of the Na^{+}/K^{+} pump: predictions from microscopic models. *Biochim Biophys Acta* 945, 1-10

- Läuger P, Stark G (1970) Kinetics of carrier-mediated ion transport across lipid bilayer membranes. *Biochim Biophys Acta* 211, 458-466
- Lafaire A V, Schwarz W (1986) Voltage dependence of the rheogenic Na^+/K^+ ATPase in the membrane of oocytes of *Xenopus laevis*. *J Mem Biol* 91, 43-51
- Lafaire A V, Schweigert B, Schwarz W (1988) Binding of ouabain to the Na-K-ATPase in oocytes of *Xenopus laevis* is voltage-independent. In: Maunsbach A B (ed) *The Na^+,K^+ -pump*, 409-416. Liss, New York
- Lapointe J-Y, Szabo G (1987) A novel holder allowing internal perfusion of patch-clamp pipettes. *Pflügers Arch* 410, 212-216
- Lee C O (1985) 200 Years of digitalis: the emerging central role of the sodium ion in the control of cardiac force. *Am J Physiol* 249, C367-C378
- Ling G, Gerard R W (1949) The normal membrane potential of frog sartorius fibres. *J Cellular Comp Physiol* 34, 383-396
- Marmor M F (1971) The independence of electrogenic sodium transport and membrane potential in a molluscan neurone. *J Physiol (Lond)* 218, 599-608
- Matsui H, Schwartz A (1966) Purification and properties of a highly active ouabain-sensitive Na^+,K^+ -dependent adenosinetriphosphatase from cardiac tissue. *Biochim Biophys Acta* 128, 380-390
- Mehdi T, Sachs F (1978) Voltage clamp of isolated cardiac Purkinje cells. *Biophys J* 21, 165a
- Mehrke G, Daut J, Hartmann S, Dischner A (1987) The effects of dihydro-ouabain on the current-voltage relation of

guinea-pig cardiomyocytes. Pflügers Arch 408 (Suppl), R10

- Milanick M A, Hoffman J F (1986) Ouabain-sensitive Na/K exchange, Na/Na exchange and uncoupled Na efflux are insensitive to changes in membrane potential, E_m , in intact human red blood cells. Biophys J 49, 548a
- Mitchell P (1963) Molecule, group and electron translocation through natural membranes. Biochem Soc Symp 22, 142-168
- Mobley B A, Page E (1972) The surface area of sheep cardiac Purkinje fibres. J Physiol (Lond) 220, 547-563
- Muir A R (1967) The effects of divalent cations on the ultrastructure of the perfused rat heart. J Anat 101, 239-261
- Nakao M, Gadsby D C (1986) Voltage dependence of Na translocation by the Na/K pump. Nature 323, 628-630
- Nakao M, Gadsby D C (1989) [Na] and [K] dependence of the Na/K pump current-voltage relationship in guinea-pig ventricular myocytes. J Gen Physiol (im Druck)
- Nakayama T, Kurachi Y, Noma A, Irisawa H (1984) Action potential and membrane currents of single pacemaker cells of the rabbit heart. Pflügers Arch 402, 248-257
- Nathan R D (1986) Two electrophysiologically distinct types of cultured pacemaker cells from rabbit sinoatrial node. Am J Physiol 250, H325-H329
- Page E, Polimeni P I (1972) Magnesium exchange in rat ventricle. J Physiol (Lond) 224, 121-139
- Page E, Storm S R (1965) Cat heart muscle in vitro. VIII. Active transport of sodium in papillary muscles. J Gen Physiol 48, 957-972

- Page E, Power B, Fozzard H A, Meddoff D A (1969)
Sarcolemmal evaginations with knob-like or stalked
projections in Purkinje fibers of the sheep's heart. *J*
Ultrastruct Res 28, 288-300
- Parker J C (1977) Solute and water transport in dog and cat
red blood cells. In: Ellory J C, Lew V L (eds)
Membrane transport in red cells, 427-465. Academic
Press, London
- Pedersen P L, Carafoli E (1987) Ion motive ATPases. I.
Ubiquity, properties, and significance to cell
function. *TIBS* 12, 146-150
- Philipson K D, Nishimoto A Y (1982) Na^+ - Ca^{2+} exchange in
inside-out cardiac sarcolemmal vesicles. *J Biol Chem*
257, 5111-5117
- Philipson K D, Nishimoto A Y (1983) ATP-dependent Na^+
transport in cardiac sarcolemmal vesicles. *Biochim*
Biophys Acta 733, 133-141
- Piper H M, Probst I, Schwartz P, Hütter F J, Spieckermann P
G (1982) Culturing of calcium stable adult cardiac
myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 14, 397-412
- Portius H J, Repke K R H (1967) Eigenschaften und Funktion
des Na^+ + K^+ -aktivierten, Mg^{++} -abhängigen
Adenosintriphosphat Phosphohydrolase-Systems des
Herzmuskels. *Acta Biol Med Ger* 19, 907-938
- Post R L, Jolly P C (1957) The linkage of sodium,
potassium, and ammonium active transport across the
human erythrocyte membrane. *Biochim Biophys Acta* 25,
118-128
- Post R L, Merritt C R, Kinsolving C R, Albright C D (1960)
Membrane adenosine triphosphatase as a participant in

- the active transport of sodium and potassium in the human erythrocyte. *J Biol Chem* 235, 1796-1802
- Rakowski R F, Paxson C L (1988) Voltage dependence of the Na/K pump current in *Xenopus* oocytes. *J Mem Biol* 106, 173-182
- Rakowski R F, De Weer P, Gadsby D C (1988) Current-voltage relationship of the backward-running Na/K pump in voltage-clamped internally-dialyzed squid giant axons. *Biophys J* 53, 223a
- Rakowski R F, Gadsby D C, De Weer P (1989) Stoichiometry and voltage dependence of the sodium pump in voltage-clamped, internally dialyzed squid giant axon. *J Gen Physiol* 93, 903-941
- Rephaeli A, Richards D, Karlsh S J D (1986a) Conformational transitions in fluorescein-labeled (Na,K)ATPase reconstituted into phospholipid vesicles. *J Biol Chem* 261, 6248-6254
- Rephaeli A, Richards D E, Karlsh S J D (1986b) Electric potential accelerates the $E_1P(Na) \rightarrow E_2P$ conformational transition of (Na,K)-ATPase in reconstituted vesicles. *J Biol Chem* 261, 12437-12440
- Reuter H (1967) The dependence of slow inward current in Purkinje fibres on the extracellular calcium-concentration. *J Physiol (Lond)* 192, 479-492
- Reynolds J A, Johnson E A, Tanford C (1985) Incorporation of membrane potential into theoretical analysis of electrogenic ion pumps. *Proc Natl Acad Sci* 82, 6869-6873
- Robinson J D, Flashner M S (1979) The $(Na^+ + K^+)$ -activated ATPase. Enzymatic and transport properties. *Biochim Biophys Acta* 549, 145-176

- Rossier B C, Geering K, Kraehenbuhl J P (1987) Regulation of the sodium pump: how and why? *TIBS* 12, 483-487
- Russo M A, Cittadini A, Dani A M, Inesi G, Terranova T (1981) An ultrastructural study of calcium induced degenerative change in dissociated heart cells. *J Mol Cell Cardiol* 13, 265-279
- Sachs J R (1970) Sodium movements in the human red blood cell. *J Gen Physiol* 56, 322-341
- Sachs J R (1977) Kinetic evaluation of the Na-K pump reaction mechanism. *J Physiol (Lond)* 273, 489-514
- Sachs J R (1986) Potassium-potassium exchange as part of the over-all reaction mechanism of the sodium pump of the human red blood cell. *J Physiol (Lond)* 374, 221-244
- Sachs J R (1988a) Phosphate inhibition of the human red cell sodium pump: simultaneous binding of adenosine triphosphate and phosphate. *J Physiol (Lond)* 400, 545-574
- Sachs J R (1988b) Interaction of magnesium with the sodium pump of the human red cell. *J Physiol (Lond)* 400, 575-591
- Sato R, Noma A, Kurachi Y, Irisawa H (1985) Effects of intracellular acidification on membrane currents in ventricular cells of the guinea pig. *Circ Res* 57, 553-561
- Schatzmann H-J (1953) Herzglykoside als Hemmstoffe für den aktiven Kalium- und Natriumtransport durch die Erythrocytenmembran. *Helv Physiol Pharmacol Acta* 11, 346-354
- Schumacher T (1986) Untersuchungen zur Regulation der intrazellulären Na-Aktivität am Schaf-Purkinjefaden

durch Na-K-Pumpe und Na-H-Austausch. Dissertation an der Fakultät für Biologie an der Ruhr-Universität Bochum

- Schuermans Stekhoven F, Bonting S L (1981) Transport adenosine triphosphatases: properties and functions. *Physiol Rev* 61, 1-76
- Schwartz A, Lindenmeyer G E, Allen J C (1972) The Na⁺, K⁺-ATPase membrane transport system: importance in cellular function. In: Bronner F, Kleinzeller A (eds) *Current topics in membranes and transport* 3, 1-82. Academic Press, New York
- Schwartz A, Lindenmeyer G E, Allen J C (1975) The sodium-potassium adenosine triphosphatase: pharmacological, physiological and biochemical aspects. *Pharmacol Rev* 27, 3-134
- Schwarz W, Lafaïre A V (1986) Membrane potential modulates the rate of the Na⁺/K⁺ pump and not the number of pumping molecules. In: Lüttgau H C (ed) *Membrane control of cellular activity*. *Progr Zool* 33, 429-434. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York
- Schwarzfeld T A, Jacobson S L (1981) Isolation and development in cell culture of myocardial cells of the adult rat. *J Mol Cell Cardiol* 13, 563-575
- Schweigert B, Lafaïre A V, Schwarz W (1988) Voltage dependence of the Na-K ATPase: measurements of ouabain-dependent membrane current and ouabain binding in oocytes of *Xenopus laevis*. *Pflügers Arch* 412, 579-588
- Segel I H (1976) *Biochemical calculations*. John Wiley & Sons Inc., New York, London, Sydney, Toronto
- Sejersted O M, Wasserstrom J A, Fozzard H A (1988) Na,K pump stimulation by intracellular Na in isolated,

intact sheep cardiac Purkinje fibers. *J Gen Physiol* 91, 445-466

Shull G E, Schwartz A, Lingrel J B (1985) Amino-acid sequence of the catalytic subunit of the $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ deduced from a complementary DNA. *Nature* 316, 691-695

Skou J C (1957) The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim Biophys Acta* 23, 394-401

Skou J C (1960) Further investigations on a $\text{Mg}^{++} + \text{Na}^+$ -activated adenosintriphosphatase, possibly related to the active, linked transport of Na^+ and K^+ across the nerve membrane. *Biochim Biophys Acta* 42, 6-23

Skou J C (1965) Enzymatic basis for active transport of Na^+ and K^+ across cell membrane. *Physiol Rev* 45, 596-617

Soejima M, Noma A (1984) Mode of regulation of the ACh-sensitive K-channel by the muscarinic receptor in rabbit atrial cells. *Pflügers Arch* 400, 424-431

Sperelakis N, Lee E C (1971) Characterization of $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ isolated from embryonic chick hearts and cultured chick heart cells. *Biochim Biophys Acta* 233, 562-579

Stimers J R, Shigeto N, Lobaugh L A, Lieberman M (1986) Ouabain sensitivity of the Na-K pump in cultured chick heart cells: voltage clamp and equilibrium binding studies. *J Gen Physiol* 88, 56a-57a

Swadner K J (1985) Enzymatic properties of separated isozymes of the Na,K-ATPase. *J Biol Chem* 260, 11508-11513

- Tanford C (1981) Equilibrium state of ATP-driven ion pumps in relation to physiological ion concentration gradients. *J Gen Physiol* 77, 223-229
- Taniguchi J, Kokubun S, Noma A, Irisawa H (1981) Spontaneously active cells isolated from sino-atrial and atrio-ventricular nodes of the rabbit heart. *Jap J Physiol* 31, 547-558
- Tanner W (1985) Ionenströme und Substratflüsse: Durch ihre Kopplung können Zellen Stoffe aktiv aufnehmen. *Biologie in unserer Zeit* 15, 8-15
- Thomas R C (1972) Intracellular sodium activity and the sodium pump in snail neurones. *J Physiol (Lond)* 220, 55-71
- Ussing H H (1954) Active transport of inorganic ions. *Symp Soc Exp Biol* 8, 407-422
- Vahouny G V, Wei R, Starkweather R, Davis C (1970) Preparation of beating heart cells from adult rats. *Science* 167, 1616-1618
- Vassalle M (1970) Electrogenic suppression of automaticity in sheep and dog Purkinje fibers. *Circ Res* 27, 361-377
- Vilsen B, Andersen J P, Petersen J, Jørgensen P L (1987) Occlusion of $^{22}\text{Na}^+$ and $^{86}\text{Rb}^+$ in membrane-bound and soluble protomeric $\alpha\beta$ -units of Na,K-ATPase. *J Biol Chem* 262, 10511-10517
- Wallick E T, Allen J C, Schwartz A (1973) Differential effects of metal chelators on Na^+ , K^+ -ATPase activity. *Arch Biochem Biophys* 158, 149-153
- Weidmann S (1951) Effect of current flow on the membrane potential of cardiac muscle. *J Physiol (Lond)* 115, 227-236

Whittam R (1962) The asymmetrical stimulation of a membrane adenosine triphosphatase in relation to active cation transport. *Biochim J* **84**, 110-118

Zimmermann A N E, Hülsmann W C (1966) Paradoxical influence of calcium ions on the permeability of the cell membranes of the isolated rat heart. *Nature* **211**, 646-647

VIIa. Anhang zum Literaturverzeichnis

Originalarbeiten:

Glitsch H G, Krahn T, Pusch H (1989) The dependence of sodium pump current on internal Na concentration and membrane potential in cardioballs from sheep Purkinje fibres. *Pflügers Arch* 414, 52-58

Glitsch H G, Krahn T, Verdonck F (1989) Activation of the Na pump current by external K and Cs ions in cardioballs from sheep Purkinje fibres. *Pflügers Arch* 414, 99-101

Glitsch H G, Krahn T, Pusch H, Suleymanian M (1989) Effects of isoprenaline on active Na transport in sheep cardiac Purkinje fibres. *Pflügers Arch* 415, 88-94

Veröffentlichte Vorträge:

Glitsch H G, Krahn T, Pusch H (1987) The Na pump current of cardioballs. *Pflügers Arch* 408 (Suppl), R10

Glitsch H G, Krahn T, Pusch H (1988) Voltage dependence of the Na pump current in isolated sheep cardiac Purkinje cells. *Pflügers Arch* 411 (Suppl), R40

Krahn T, Glitsch H G, Pusch H (1988) Isolation, cultivation and internal perfusion of Purkinje cells from sheep heart. *Pflügers Arch* 411 (Suppl), R37

Glitsch H G, Krahn T, Pusch H (1988) Voltage dependence of Na pump current in isolated sheep cardiac Purkinje cells at two concentrations of the external pump activator Cs. *Pflügers Arch* 412 (Suppl), R31

Glitsch HG, Krahn T, Pusch H (1989) Na pump current-voltage relationship of isolated sheep cardiac Purkinje cells at various intracellular Na concentrations. *J Physiol (Lond)* 407, 123P

Tabellarischer Lebenslauf

Thomas Krahn

Malmkestr.64

58 Hagen 1

21.04.1959		in Hagen in Westfalen geboren
April 1965-Juli 1968		Besuch der Volksschule in Hagen-Boele
Sept. 1968-Juli 1969		Besuch der Hauptschule in Hagen-Boele
Aug. 1969-Juni 1975		Besuch der Realschule in Hagen-Boele
		Abschluß: Mittlere Reife
Aug. 1975-Juni 1978		Besuch des Gymnasiums in Hagen-Haspe
		Abschluß: Abitur
Juli 1978-Sept. 1978		Studienaufenthalt in Nordamerika
Okt. 1978-Dez. 1978		Aushilfstätigkeit bei der Hoesch AG
Jan. 1979-Dez. 1980		Dienst im Sanitätswesen der Bundeswehr
Okt. 1980-März 1986		Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum
		Abschluß: Diplom
Feb. 1986-April 1986		Studienaufenthalt in Neuseeland
Mai 1986-dato		Aufbaustudium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum
		Angestrebter Abschluß: Promotion

